

Aus dem Institut für Klinische Zytobiologie und Zytopathologie

Direktor: Prof. Dr. Roland Lill

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

---

# **Komponenten und Wege von post-Golgi Vesikeln beim Transport zur apikalen Plasmamembran**

---

## **Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Karina Ringer**

aus Dingolfing

Marburg, 2020

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der  
Philipps-Universität Marburg  
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer  
Creative Commons  
Namensnennung  
Keine kommerzielle Nutzung  
Weitergabe unter gleichen Bedingungen  
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 06.04.2020

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekan: Herr Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. Ralf Jacob

Korreferent: Prof. Dr. Dominik Oliver

*Für meine Familie*



## Zusammenfassung

Die Plasmamembran von polaren Epithelzellen besitzt eine asymmetrische Organisation, die durch eine funktionell und morphologisch unterscheidbare apikale und basolaterale Domäne charakterisiert ist. Diese Polarität ist Voraussetzung für die Integrität des Epithelgewebes und den gerichteten Proteintransport. Die Entstehung und Aufrechterhaltung der zellulären Polarität hängt von einer hochspezialisierten zellulären Sortier- und Transportmaschinerie ab.

Die Mikrotubuli sind ein wichtiger Bestandteil der Transportmaschinerie und stellen die Transportwege für die Beförderung von Vesikeln bereit. Wichtige Merkmale von Mikrotubuli sind die vielfältigen posttranslationalen Modifikationen. Eine dieser Modifikationen stellt die Detyrosinierung am C-Terminus des  $\alpha$ -Tubulins dar. Im Kreislauf der Tyrosinierung und Detyrosinierung wird dieses Tyrosin durch einen Vasohibin/Chaperon-Komplex entfernt und kann durch die Tubulin Tyrosin Ligase (TTL) wieder angefügt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der Detyrosinierung auf die Zellpolarität von MDCK-Zellen, Epithelzellen der Hundeniere, untersucht. Der TTL-*Knockout* führte zu einer dramatischen Erhöhung der detyrosinierten Tubulin-Menge sowie zu einem Anstieg an acetyliertem Tubulin. Die Veränderung des Tubulin-Gehalts hin zu detyrosiniertem oder tyrosiniertem Tubulin durch Modulation der TTL-Expression beeinflusste die epitheliale Morphologie der Zellen. Interessanterweise waren TTL-*Knockout* Zellen mobiler als TTL-überexprimierende Zellen. Darüber hinaus scheinen detyrosinierte Mikrotubuli die Anzahl und Größe von fokalen Adhäsionen zu beeinflussen. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass eine dynamische Anpassung von detyrosinierten und tyrosinierten Mikrotubuli für den regulierten Ablauf der Zellpolarisierung, der Migration sowie der Adhäsion essentiell ist.

Neben Mikrotubuli besteht die Sortier- und Transportmaschinerie aus einem breiten Spektrum bestimmter Proteine, die für die Sortierung und Beförderung zur jeweiligen Membrandomäne wichtig sind. Dazu zählen Motorproteine, Adapterproteine, Lektine, Rab-Proteinen und die zu transportierenden Proteine. Darunter befindet sich auch die große GTPase *Myxovirus Resistance Protein 1* (Mx1), ein Mitglied der Dynamin-Superfamilie. Dieses Protein wurde auf apikalen post-Golgi Vesikeln identifiziert. Mx-Proteine gelten als streng Interferon-reguliert, die nur nach einer viralen Infektion exprimiert werden. In MDCK-Zellen besitzt Mx1 keine antivirale Aktivität und es wird konstitutiv exprimiert. Viele charakteristische Eigenschaften der Mx-Proteine lassen auf eine Funktion in grundlegenden, zellulären Prozessen schließen. So wurde die große GTPase als wichtige regulatorische Komponente des apikalen Transportsystems

identifiziert. Dabei befindet sich die große GTPase auf frühen und späten sekretorischen Kompartimenten. Da Mx1-positive Strukturen sehr beweglich sind und ein dynamisches Verhalten aufweisen, wurde mit Hilfe von Lebendzellaufnahmen die Dynamik dieser Strukturen in Abhängigkeit des Mikrotubuli-Zytoskeletts untersucht. Die Depolymerisation der Mikrotubuli durch Nocodazol führte zu einem eingeschränkten Langstreckentransport. Mittels biochemischer und fluoreszenzmikroskopischer Methoden war es möglich, die Assoziation von caninem Mx1 mit  $\alpha$ -Tubulin nachzuweisen. Außerdem konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Mx1 mit dem Kinesin-Motorprotein Kif5B interagiert. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung führte der *Knockout* von Mx1 oder die Mutation im Membraninteraktions-Motiv der unstrukturierten L4-Schleifenregion zu einem verminderten apikalen Proteintransport. Diese Mx1-Mutante war trotz mutiertem Membraninteraktions-Motiv in der Lage an Kif5B zu binden. Jedoch führte die Mutation zur Elongation der Mx1-positiven Kompartimente. Es ist daher denkbar, dass Mx1 aufgrund der Strukturähnlichkeiten mit den klassischen Dynaminen auch eine Funktion in der Abschnürung von Transportvesikeln besitzt.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die funktionale Rolle der großen GTPase Mx1 im apikalen Proteintransport aufgezeigt werden. Mx1 stabilisiert nicht nur die Assoziation zwischen Kif5B, den Mikrotubuli und apikalen Transportvesikeln sondern unterstützt auch die Vesikelfission.

## Summary

The plasma membrane of epithelial cells shows an asymmetric organization, characterized by a functionally and morphologically distinct apical and basolateral domain. This polarity is a prerequisite for the integrity of an epithelial tissue and for the directional transport. The establishment and the maintenance of cellular polarity depend on a highly specialized cellular sorting and transport machinery.

Microtubules are an important component of this transport machinery and they provide tracks for the vesicular transport. Important features of microtubules are diverse posttranslational modifications. The detyrosination represents a form of modification that occurs on the C-terminus of  $\alpha$ -tubulin. Within the tyrosination/detyrosination-cycle the tyrosine is removed by a vasohibin/chaperon complex and subsequently re-added by tubulin tyrosine ligase (TTL). As part of this work, the influence of tubulin detyrosination on cellular polarity of MDCK kidney epithelial cells was studied. Knocking out TTL resulted in a dramatic increase in the level of detyrosinated tubulin as well as acetylated tubulin. Changing tubulin contents towards detyrosinated or tyrosinated microtubules by modulating TTL expression affected the epithelial morphology. Interestingly, TTL knockout cells were more mobile than cells overexpressing TTL. Furthermore, detyrosinated microtubule possibly influenced the number and size of focal adhesions. The presented observations indicate that a dynamic adaptation of detyrosinated and tyrosinated microtubules is essential for the regulation of cellular polarization, migration and adhesion.

Beside microtubules, the sorting and transport machinery consist of a diverse set of proteins, which are crucial for cargo delivery to the correct membrane domain. These include motor proteins, adaptor proteins, lectins, Rab-GTPases and cargo molecules. Among these components, the large GTPase Myxovirus Resistance Protein 1 (Mx1), a member of the dynamin superfamily, was identified on apical post-Golgi vesicles. Mx-proteins are known as interferon induced proteins, which are expressed after viral infection. In MDCK cells, Mx1 shows no antiviral activity and is constitutively expressed. Mx-proteins exhibit many characteristic properties that suggest functions in basic cellular processes. The large GTPase was identified as an important regulatory component of the apical transport system. Thereby, the large GTPase associates with compartments of the early and late secretory pathway. Since vesicular structures positive for Mx1 are highly dynamic, the influence of the microtubule cytoskeleton on this motility was studied using live cell imaging. Microtubule disruption induced by nocodazole, inhibits long-range trafficking. Using biochemical and fluorescence microscopic methods, the association of

canine Mx1 with  $\alpha$ -tubulin was verified. Furthermore, it was demonstrated for the first time that Mx1 interacts with the motor protein Kif5B. In agreement with these observations the knockout of Mx1 or mutation in the membrane interaction motif of the unstructured L4 loop decreased the efficiency of apical cargo delivery. The L4 loop mutant still interacts with Kif5B, however the mutation causes elongation of Mx1-positive compartments. It is thus conceivable that Mx1 functions in the fission of transport vesicles based on structural similarities to classical dynamins.

For the first time, this work shows a functional role of the large GTPase Mx1 in the apical protein trafficking. Mx1 not only stabilizes the interaction between Kif5B, microtubules and apical transport carriers, but also aids in vesicle fission.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	I
<b>Summary</b> .....	III
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	V
<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1. Das Epithel und polare Epithelzellen .....	1
1.2. Ausbildung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität .....	3
1.2.1. Sortiersignale und Transportmechanismen.....	4
1.2.2. Der polare Proteintransport .....	5
1.2.3. Einfluss des Zytoskeletts im polaren Proteintransport .....	7
1.3. Mx1 - eine neue Komponente im apikalen Proteintransport.....	9
1.3.1. Die Dynamin-Superfamilie der großen GTPasen .....	9
1.3.2. Mx-Proteine .....	14
1.4. Das Tubulin-Zytoskelett.....	18
1.4.1. Aufbau und Eigenschaften von Mikrotubuli .....	18
1.4.2. Kinesine – Mikrotubuli-assoziierte Motorproteine .....	19
1.4.3. Posttranslationale Modifikationen der Mikrotubuli.....	21
1.4.4. Die Tyrosinierung und Detyrosinierung von Mikrotubuli.....	23
1.5. Bedeutung von Mikrotubuli bei der Zellmigration.....	25
1.6. Fragestellung dieser Arbeit.....	27
<b>2. Material und Methoden</b> .....	29
2.1. Material und Software .....	29
2.2. Chemikalien und Reagenzien.....	31
2.3. Verbrauchsmaterialien .....	32
2.4. Immunologische Reagenzien .....	33
2.5. Zellkultur .....	34
2.5.1. Verwendete Zelllinien.....	34
2.5.2. Medien, Lösungen und verwendete Zelllinien .....	36
2.5.3. Subkultivierung und Passagieren der Zellen .....	37
2.5.4. Kryokonservierung und Auftauen von Kulturzellen .....	38
2.5.5. Bestimmung der Zellzahl.....	38
2.5.6. Transfektion.....	39
2.6. Zellbiologische Methoden.....	42
2.6.1. Transepitheliale Widerstands (TER)-Messung .....	42
2.6.2. Behandlung von Zellen .....	43
2.6.3. Scratch-Assay .....	44

2.7. Molekularbiologische Methoden .....	44
2.7.1. Ortspezifische Mutagenese .....	44
2.7.2. Transformation chemisch-kompetenter Escherichia coli-Bakterien .....	46
2.7.3. Präparation von Plasmiden .....	47
2.7.4. Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	48
2.7.5. Agarosegel-Elektrophorese .....	48
2.8. Proteinbiochemische Methoden .....	49
2.8.1. Herstellung von Zelllysaten .....	49
2.8.2. Proteinbestimmung nach Lowry .....	50
2.8.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	50
2.8.4. Western Blot und Immunodetektion .....	52
2.8.5. Immunpräzipitation .....	53
2.8.6. Isolation von Exosomen .....	59
2.8.7. Sekretionsstudie .....	60
2.8.8. Fraktionierung von löslichem und polymerisiertem Tubulin .....	61
2.9. Fluoreszenzmikroskopische Methoden .....	62
2.9.1. Immunfluoreszenzfärbung an Zellen .....	62
2.9.2. <i>In situ</i> Proximity Ligation Assay .....	62
2.9.3. Lebendzell-Mikroskopie .....	64
2.9.4. <i>Total Internal Reflection Fluorescence-Microscopy</i> .....	65
2.9.5. Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) .....	66
2.9.6. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie .....	67
2.9.7. STED-Mikroskopie .....	69
2.10. Auswertung und Statistik .....	70
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
3.1. Der Einfluss der Detyrosinierung auf die Zellpolarität sowie die Adhäsion und die Migration .....	72
3.1.1. Der Einfluss der Tubulin Tyrosin Ligase-Expression auf das polare Wachstum .....	72
3.1.2. Untersuchung der Mikrotubuli-Dynamik .....	76
3.1.3. Die Auswirkung der Detyrosinierung auf das Migrationsverhalten und die zelluläre Adhäsion .....	79
3.1.4. Stabile, detyrosinierte Mikrotubuli befinden sich in räumlicher Nähe zu Vinculin .....	85
3.2. Die Rolle von Mx1 im intrazellulären Proteintransport .....	88
3.2.1. Die subzelluläre Lokalisation von Mx1 .....	88
3.2.2. Untersuchung der Assoziation von Mx1 mit intrazellulären Membranstrukturen .....	91
3.2.3. Charakterisierung der Dynamik von Mx1-positiven Strukturen .....	93

3.2.4. Mx1 assoziiert mit dem Mikrotubuli-Netzwerk .....	97
3.2.5. Mx1 interagiert mit dem Motorprotein Kif5B .....	101
3.2.6. Der <i>Knockout</i> von Mx1 führt zu einer verringerten Proteinsekretion .....	105
3.2.7. Untersuchung des Membran-Interaktionsmotivs der großen GTPase Mx1 .....	107
3.2.8. Die Mutation im Membran-Interaktionsmotiv verändert das Verhalten von Mx1 und führt zu Veränderungen im apikalen Proteintransport .....	114
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>118</b>
4.1. Die Detyrosinierung beeinflusst die Zellpolarisierung, die Zellmigration und die Zelladhäsion .....	118
4.1.1. Die Detyrosinierung beeinflusst die Form der Zellen sowie die Zellpolarität .....	118
4.1.2. Die Detyrosinierung beeinflusst die Zellmigration und die Dynamik fokaler Adhäsionen .....	121
4.2. Mx1 bindet Kif5B für den Proteintransport entlang von Mikrotubuli .....	125
4.2.1. Mx1 assoziiert mit zellulären Kompartimenten .....	126
4.2.2. Mx1 assoziiert dynamisch mit intrazellulären Membranstrukturen .....	129
4.2.3. Die Interaktion zwischen Kif5B, Mikrotubuli und apikalen Transportvesikeln wird durch Mx1 stabilisiert .....	132
4.2.4. Mx1 unterstützt den Prozess der Vesikelabschnürung .....	137
4.3. Zusammenfassung und Ausblick .....	143
<b>5. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>148</b>
<b>6. Anhang .....</b>	<b>170</b>
6.1. Ergänzende Ergebnisse .....	170
6.2. Abkürzungsverzeichnis .....	173
6.3. Abbildungsverzeichnis .....	175
6.4. Tabellenverzeichnis .....	176
6.5. Lebenslauf .....	177
6.6. Publikationen und Beiträge auf Konferenzen .....	178
6.7. Verzeichnis der akademischen Lehrer .....	178
6.8. Danksagung .....	179
6.9. Ehrenwörtlich Erklärung .....	181

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Epithel und polare Epithelzellen

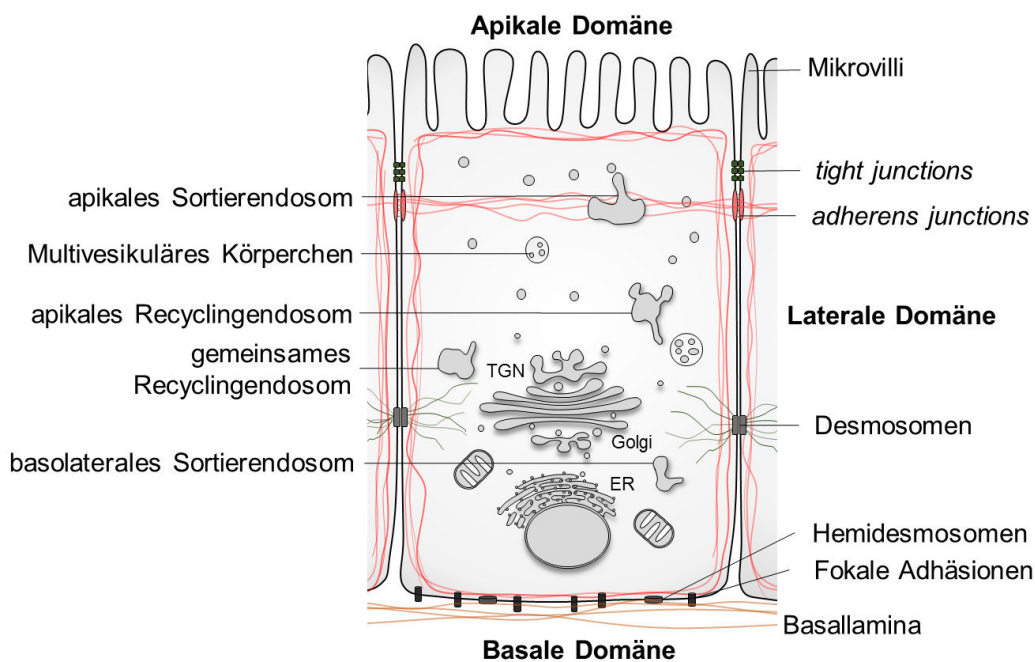
Eine Zelle ist die kleinste, funktionierende Baueinheit eines Organismus. In höher entwickelten Organismen kommen viele verschiedene Zellarten vor, die sich in Form, Funktion und Lebensdauer stark voneinander unterscheiden können. Ein Verband gleichartig differenzierter Zellen, die in Einheiten zusammenarbeiten, um eine oder mehrere bestimmte Aufgabe auszuüben, wird als Gewebe bezeichnet. Gewebe und Organe sind die nächst höheren Organisationsformen von Zellen. Jedes Gewebe ist dabei durch spezifische Zelltypen, die je nach Aufgabe und Funktion eine unterschiedliche Zusammensetzung von Proteinen, Größe und Form aufweisen, charakterisiert. Die verschiedenen Gewebe werden in vier Grundgewebetypen eingeteilt: das Binde- bzw. Stützgewebe sowie das Muskel-, das Nerven-, und das Epithelgewebe.

Das Epithel ist aus einem geschlossenen Verband von dicht aneinander liegenden Epithelzellen charakterisiert. Dabei bedeckt es die äußeren Oberflächen und kleidet die inneren Hohlräume aller Organe aus. Dabei verhindert das Epithelgewebe als Diffusionsbarriere den unkontrollierten Stoffaustausch zwischen dem Organismus und seiner Umwelt und übt gleichzeitig eine Schutzfunktion aus. Zusätzlich stellt es eine Barriere gegen Pathogene dar. Je nach Anforderung nehmen die unterschiedlichen Epithelgewebe spezielle Funktionen wahr (Ross & Pawlina, 2011; Roignot et al., 2013). Alle Epithelien interagieren mit der Außenwelt und haben die Fähigkeit des gerichteten Stoffaustausches, der unerlässlich für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase ist (Ross & Pawlina, 2011).

Diese vielfältigen Aufgaben bedingen spezifische Anforderungen an die ins Gewebe eingebundenen Zellen. Aus diesem Grund sind Epithelzellen polar differenziert und besitzen spezielle Zell-Zell-Verbindungen, welche die aneinanderlegenden Zellen zu einem dichten Verband verknüpfen. Auf diese Weise kann eine kontinuierliche, zusammenhängende Zellschicht geformt werden (Abb. 1.1.) (Ross & Pawlina, 2011; Fristrom, 1988). Unmittelbar unter dem Epithel trennt die Basalmembran, eine dünne, zellfreie Zone, bestehend vor allem aus Kollagen Typ IV und Proteoglykanen, die Epithelzellen vom benachbarten Gewebe (Ross & Pawlina, 2011). Durch die morphologische und funktionelle Zellpolarität wird die Plasmamembran von Epithelzellen in drei strukturell und funktionell unterschiedliche Domänen unterteilt. Diese Domänen unterscheiden sich folglich in ihrer Lipid- und Proteinzusammensetzung (Roignot et al., 2013; Willenborg & Prekeris, 2011). Als apikale Membran wird dabei die dem Lumen zugewandte Zelloberfläche bezeichnet, die eine Austauschfläche zur Außenwelt darstellt. Sie enthält bestimmte Proteine, wie zum Beispiel die Saccharase-Isomaltase (SI) oder die Laktase-Phlorizin-Hydrolase (LPH), welche ausschließlich an der apikalen



Membran vorkommen und für sekretorische und resorptive Aufgaben benötigt werden (Roignot et al., 2013; Delacour & Jacob, 2006). Zur Oberflächenvergrößerung verfügt die apikale Membran mancher Epithelzellen über einen Bürstensaum bestehend aus Mikrovilli. Die basale Domäne verbindet die Zelle mit Hilfe von verankernden Kontakten mit der Basalmembran. Die laterale Membran ist durch das Vorhandensein von verschiedenen Zell-Zell-Kontakten charakterisiert, die sich zwischen den benachbarten Zellen befinden. Wegen der ähnlichen Membranzusammensetzung der basalen und lateralen Domäne, bilden sie eine funktionelle Einheit und werden oft als basolaterale Membrandomäne zusammengefasst (Ross & Pawlina, 2011; Roignot et al., 2013).



**Abb. 1.1. Aufbau einer polaren Epithelzelle**

Schematischer Aufbau einer typischen polaren Zelle mit Mikrovilli und ihren Zell-Zell- bzw. Zell-Basallamina-Verbindungen. Die Plasmamembran einer polaren Epithelzelle ist in eine apikale, laterale und basale Domäne eingeteilt. An der lateralen Membrandomäne befinden sich *tight junctions*, die eine Permeabilitätsbarriere zwischen apikaler und lateraler Membran bilden, sowie *adherens junctions*, *gap junctions* (nicht abgebildet) und Desmosomen. Die basale Membran interagiert über fokale Adhäsionen und Hemidesmosomen mit der Basalmembran. Die Zelle enthält außerdem verschiedene zelluläre Kompartimente. In Rot sind Aktin-Filamente dargestellt, in Grün sind Intermediärfilamente dargestellt.

Spezialisierte verschließende Zell-Zell-Verbindungen, die *tight junctions* der *Zonula occludens*, sind für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der distinkten Membrandomänen verantwortlich. Sie umschließen die Zelle gürtelförmig und verhindern so die laterale Diffusion der Membrankomponenten (van Meer & Simons, 1986; Willenborg & Prekeris, 2011). Aufgebaut sind *tight junctions* aus zwei Transmembranproteintypen, den Claudinen und Occludinen. Assoziierte zytoplasmatische Proteine, die *Zonula occludens* Proteine verbinden die *tight junctions* mit dem Aktin-Zytoskelett der Epithelzellen (Hartsock & Nelson, 2008; Ross & Pawlina, 2011). Ebenfalls verhindern die *tight junctions* den parazellulären Transport, indem sie

eine Diffusionsbarriere ausbilden und so den Interzellularraum verschließen. Weitere Zell-Zell-Kontakte befinden sich auf der basalen Seite der *Zonula occludens*, darunter verankernde Verbindungen, wie die *adherens junctions* und die Desmosomen (Giepmans & Ijzendoorn, 2009; Ross & Pawlina, 2011). Eine weitere Art der Zell-Zell-Verbindungen stellen *gap junctions*, die einen direkten Stoffaustausch sowie Informationsaustausch zwischen benachbarten Zellen ermöglichen, dar. Um die Verbindung der basalen Membran der Epithelzelle zur extrazellulären Matrix zu gewährleisten, werden fokale Adhäsionen und Hemidesmosomen ausgebildet (Ross & Pawlina, 2011). Die Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte und die Aufrechterhaltung der zellulären Polarität sind essentiell für die strukturelle Integrität komplexer Gewebe und für die jeweilige physiologische Funktion der einzelnen Zellen des Epithels. Kommt es zum Verlust der Zell-Zell-Adhäsionen oder der Polarität kann dies zu verschiedenen Krankheitsbildern, darunter auch Krebs, führen (Banks & Humbert, 2008; Martin-Belmonte & Perez-Moreno, 2012).

## **1.2. Ausbildung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität**

Entscheidend für die Bildung eines funktionalen Gewebes ist die koordinierte Polarisierung aller Zellen. Dabei handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, bei dem zunächst Zell-Matrix- und Zell-Zell-Kontakte den Vorgang der Polarisierung in Gang setzen. Diese definieren die Membrandomänen. Abhängig davon wird die asymmetrische Anordnung von Polaritätskomplexen reguliert. Auf diese Weise kann eine polare Organisation innerhalb der Zelle entstehen. Für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität sind vor allem der gerichtete, polare Proteintransport zu den vorher definierten Membrandomänen sowie die Umstrukturierung des Zytoskeletts von bedeutender Rolle (Bryant & Mostov, 2008; Mellman & Nelson, 2008; Roignot et al., 2013).

Polare Epithelzellen sind durch zwei Plasmamembranen, die in ihrer Funktion unterschiedlich, charakterisiert. Die Membranen sind durch *tight junctions* voneinander getrennt. Um ihre Funktion im gerichteten Transport ausüben zu können, besitzen die beiden Domänen unterschiedliche Lipid-, Protein- und auch Zucker-Zusammensetzungen. Der Entstehung und Aufrechterhaltung dieser unterschiedlichen Domänen liegt eine strikte Regulation zugrunde. Wesentlich ist die exakte Lokalisierung bestimmter Proteine und Transportsysteme an der apikalen und basolateralen Zelloberfläche. Dies wird durch hochspezialisierte Transport- und Sortierprozesse gewährleistet. Zudem müssen Proteine an den beiden Plasmamembranen gezielt endozytiert und anschließend degradiert oder recycelt werden (Mostov et al., 2000). Die Notwendigkeit des intakten und streng regulierten Proteintransports in Epithelzellen wird

durch verschiedene Krankheitsbilder deutlich. Kommt es zu einer Störung oder Veränderungen in diesen Prozessen können Defekte mit schwerwiegenden Folgen auftreten. Betroffen sind dabei vor allem Organe, wie Leber, Darm oder Niere, für deren Funktion die Zellpolarität wesentlich ist (Stein et al., 2002; Gissen & Maher, 2007). Darüber hinaus ist die Integrität der epithelialen Architektur ausschlaggebend für die Unterdrückung der Tumorentstehung. Die meisten Tumore beim Menschen haben ihren Ursprung im Epithelgewebe, denn zu den typischen Kennzeichen von Tumorzellen zählt, neben der unbegrenzten Zellteilung, eben auch der Verlust der Zellpolarität. Dies führt zur Desorganisation des Gewebes (Royer & Lu, 2011; Martin-Belmonte & Perez-Moreno, 2012). Im wissenschaftlichen Interesse stehen deswegen das Verständnis über den Mechanismus des polaren Proteintransports und der Aufrechterhaltung der zellulären Polarität.

### **1.2.1. Sortiersignale und Transportmechanismen**

Sowohl apikale als auch basolaterale Proteine sind durch verschiedene Proteinmodifikationen oder auch durch interne, topogene Signale markiert. Diese Signale werden erkannt und stellen die Sortierung zur jeweils richtigen Membran sicher (zur Übersicht siehe: Rodriguez-Boulán et al., 2005; Mellman & Nelson, 2008)

Die Informationen für die apikale Sortierung besitzen eine große Diversität (Mellman & Nelson, 2008). Im Gegensatz zu den basolateralen Sortiersignalen sind hierbei weniger bestimmte Sequenzmotive entscheidend, vielmehr spielen im apikalen Transport verschiedene Proteinmodifikationen eine Rolle. Dazu zählen bestimmte Merkmale in der Transmembrandomäne, wie die Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Verankerung (Lisanti et al., 1988) oder Glykosylierungen (N- und O-Glykosylierungen) (Scheiffele et al., 1995; Yeaman et al., 1997). Neben diesen Modifikationen enthalten bestimmte Proteine aber auch Sequenzen in der zytoplasmatischen Domäne. Ein gut charakterisiertes Beispiel ist Rhodopsin (Chuang & Sung, 1998), das durch Dynein über eine solche Signalsequenz gebunden und zur apikalen Membran befördert wird (Tai et al., 1999). Andere apikale Proteine, wie Megalin (Marzolo et al., 2003; Takeda et al., 2003), enthalten zytoplasmatische Motive, die noch nicht genau charakterisiert sind (Rodriguez-Boulán et al., 2005).

Als eine weitere Möglichkeit der apikalen Sortierung werden sogenanntem *Lipid Rafts* diskutiert, die als Proteinsortierplattform dienen und die Bildung distinkter Vesikelpopulationen bestimmen. Es handelt sich dabei um Membranmikrodomänen, die mit Cholesterol, Sphingolipiden und Glykolipiden angereichert sind. Sie entsprechen somit der Lipid-Zusammensetzung der apikalen Membran (van Meer & Simons, 1988; Simons & Ikonen, 1997). Beschrieben und definiert werden *Lipid Rafts* als unlösliche

Areale einer Zellmembran, die gegenüber nicht ionischen Detergenzien resistent sind. Die *Lipid Raft*-Hypothese postuliert, dass Proteine zur apikalen Membran sortiert werden, da diese sich aufgrund ihrer hohen Affinität in diesen lokalen Mikrodomänen sammeln. Gebildet werden *Lipid Rafts* im Komplex des Golgi-Apparates. Zusammen mit den assoziierten Proteinen akkumulieren sie zu einer Sortierplattform, die erkannt wird und in apikale Transportintermediate aufgenommen werden. Anschließend erfolgt die Beförderung zur apikalen Membran (Rodriguez-Boulán et al., 2005). Unterstützt wird diese Hypothese durch Beobachtungen, dass GPI-verankerte Proteine sich in den Detergenz-resistenten Mikrodomänen ansammeln und zur apikalen Membran transportiert werden (Brown & Rose, 1992; Paladino et al., 2004). Eine Depletion von Cholesterin und Sphingolipiden bedingt das Fehlsortieren von GPI-Proteinen (Mays et al., 1995). Mittlerweile ist bekannt, dass einige Proteine *Lipid Raft*-abhängig zum apikalen Zellpol befördert werden, wie die Saccharase-Isomaltase. Andere Proteine werden allerdings auch *Lipid Raft*-unabhängig transportiert, wie die Laktase-Phlorizin-Hydrolase oder der Neurotrophinrezeptor p75<sup>NTR</sup> (Jacob & Naim, 2001; Delacour et al., 2006). Da folglich die Zusammensetzung in diesen Mikrodomänen von der umgebenden Membran unterschiedlich ist, bilden *Lipid Rafts* eine Möglichkeit der Kompartimentbildung (Mollinedo & Gajate, 2015). Auf diese Weise könnten diese Mikrodomänen eine ausschlaggebende Rolle in der Sortierung von apikalen Proteinen einnehmen und stabile Proteinsortierplattform für den Proteintransport bilden (Simons & van Meer, 1988; Simons & Wandinger-Ness, 1990; Stoops & Caplan, 2014).

### 1.2.2. Der polare Proteintransport

Hat die Zelle einmal ihre polare Struktur erreicht, ist für die Aufrechterhaltung ein spezifischer Sortier- und Transportmechanismus nötig (Carmosino et al., 2010; Delacour & Jacob, 2006). Bisher sind verschiedene Transportwege in polaren Epithelzellen identifiziert worden (Rodriguez-Boulán et al., 2005), die oft in komplexen, mehrstufigen Prozessen ablaufen und in denen Proteine auf dem Weg zur Plasmamembran eine Vielzahl von Kompartimenten passieren (Mostov et al., 2000).

Der biosynthetische Weg beginnt mit der Proteinbiosynthese im rauen endoplasmatischen Retikulum (ER). Das ER ist ein Membransystem, das aus miteinander verbundenen Membranvesikeln besteht und das gesamte Zytoplasma durchzieht (Presley et al., 1997). Nach der Synthese werden die Polypeptide dort gefaltet und teilweise auch zu Proteinkomplexen oligomerisiert. Sind die Proteine bereit, das ER zu verlassen, werden sie in Transportvesikel verpackt und über einen COPII-vermittelten Vesikeltransport zum Golgi-Apparat transportiert (Gissen & Maher, 2007; Mellman & Nelson, 2008). Auf dem Weg dorthin passieren die synthetisierten Proteine die

tubulovesikuläre Membranansammlungen des ER-Golgi Intermediärkompartiments (ERGIC) (Appenzeller-Herzog & Hauri, 2006). Von dort werden sie zum Golgi-Apparat transportiert. Nach dem Durchlaufen der verschiedenen Zisternen erreichen die Proteine das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN). Das TGN gilt klassischer Weise als Sortierstelle für neu synthetisierte apikale und basolaterale Proteine, da dort die Unterteilung in distinkte Transportrouten stattfinden kann (Griffiths & Simons, 1986). Demnach verlassen bestimmte Proteine, wie das Influenza HA und das *Vesicular stomatitis* Virus Glykoprotein G (VSV-G), das TGN in getrennten Vesikeln. Sie werden anschließend zur apikalen bzw. basolateralen Membran transportiert (Matlin & Simons, 1984; Misek et al., 1984; Rindler et al., 1984; Rodriguez-Boulán et al., 1984). Später konnten diese Beobachtungen bestätigt werden (Keller et al., 2001; Hua et al., 2006; Paladino et al., 2006). Allerdings gibt es auch Sortiermechanismus, der erst nach Verlassen des TGN in den endosomalen Kompartimenten als Zwischenstationen des Transports stattfindet. So wurde für den direkten apikalen Transport von *Lipid Raft*-abhängigen und *Lipid Raft*-unabhängigen Vesikelpopulationen gezeigt, dass die Separation der apikalen Membranproteine SI und LPH erst nach dem TGN stattfindet (Jacob & Naim, 2001). Spätere Studien zeigten, dass beide Proteine Rab4, -8 und -11 positive Endosomen durchlaufen (Cramm-Behrens et al., 2008). Andere apikale Proteine nutzen an Stelle des direkten Weges einen Umweg über die basolaterale Membrandomäne. Dieser indirekte Transportweg von apikalen Proteinen wird auch als Transzytose bezeichnet. Der polymere Immunglobulin Rezeptor (pIg-R) ist ein gut charakterisiertes Protein des transzytotischen Transportweges. Zunächst wird neu synthetisierter pIg-R zur basolateralen Oberfläche sortiert, anschließend endozytotisch aufgenommen und über das gemeinsame Recyclingendosom (common recycling endosome, CRE) und das apikale Recyclingendosom (*apical recycling endosome*, ARE) zum apikalen Zellpol geleitet (Weisz & Rodriguez-Boulán, 2009). Zur Regulierung der Plasmamembran-Zusammensetzung und zum Rezirkulieren von Membrankomponenten dient der Vorgang der Endozytose (Doherty & McMahon, 2009). Endozytierte Proteine werden nach der Wiederaufnahme in frühen Endosomen transportiert. Es gibt zwei Arten von frühen Endosomen, die sich in ihrer Funktion unterscheiden. Sie sind bekannt als apikales frühes Endosom (*apical early endosome*, AEE) und basolaterales frühes Endosom (*basolateral early endosome*, BEE) (Matter & Mellman, 1994). Anschließend folgt der Transport in das CRE, das sowohl apikale als auch basolaterale Proteine sortiert. Von dort werden die Proteine über den exozytotischen Weg wieder zurück zur Plasmamembran recycelt (Rodriguez-Boulán et al., 2005).

Wichtige Stationen des intrazellulären Proteintransports stellen Endosomen dar, die sich durch die Anwesenheit verschiedener Rab (*Ras-related in brain*)-Proteine

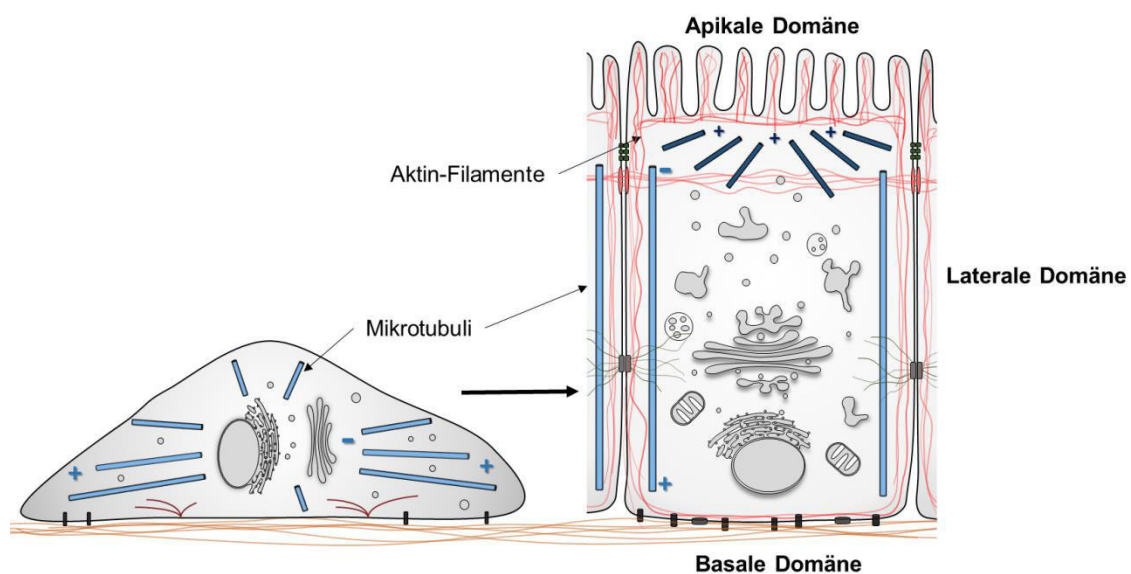
identifizieren lassen. Rab-Proteine sind kleine, GTP-bindende Proteine der Ras Superfamilie, die zwischen dem Zytosol und verschiedenen Membranen zirkulieren (Corbeel & Freson, 2008). Gebunden an Membranen regulieren sie die Bildung, den Transport sowie die Fusionsereignisse von Vesikeln im endosomalen Netzwerk der Zelle (zur Übersicht siehe: Hutagalung & Novick, 2011). Mehr als 60 verschiedene humane Rab-Proteine wurden bisher identifiziert (Pfeffer, 2007). Innerhalb der Zelle besitzen Rab-Proteine eine charakteristische subzelluläre Lokalisation. Zu finden sind sie in allen Kompartimenten des Endomembransystems, im Zellkern, an der Plasmamembran (einschließlich Zell-Verbindungen und fokale Adhäsionen), in den Mitochondrien und an den Centriolen (Schwartz et al., 2007). Die einzelnen endosomalen Kompartimente sind durch die Anwesenheit dieser kleinen GTPasen charakterisiert. Daher sind Rab-Proteine beliebte Markerproteine zur Unterscheidung verschiedener Endosomen.

### **1.2.3. Einfluss des Zytoskeletts im polaren Proteintransport**

Der intrazelluläre Proteintransport in eukaryotischen Zellen hängt aufgrund der komplexen Organisation und der zu überwindenden langen Distanzen von einem aktiven und gerichteten Transportmechanismus ab. Die korrekte und gezielte Beförderung von Transportvesikeln wird durch ein Netzwerk aus Zytoskelett-Strukturen gewährleistet. Mit Hilfe von Motorproteinen, die sich entlang dieser Strukturen durch die Zelle bewegen, werden die Proteine zu ihrem Bestimmungsort transportiert (Ando et al., 2015). Das Zytoskelett kann in drei Arten von polymeren Strängen eingeteilt werden, den Aktin-Filamenten, den Mikrotubuli (MTs) und den Intermediärfilamenten. Innerhalb der Zelle dient das Zytoskelett nicht nur zur Stabilisation, sondern nimmt auch eine bedeutende Rolle bei Transportvorgängen ein. Aktin-Filamente gewährleisten den Transport über kurze Strecken, wohingegen Mikrotubuli für den Langstreckentransport genutzt werden (Atkinson et al., 1992; Langford, 1995).

Damit Epithelzellen ihre polare Architektur erhalten und der gerichtete Transport von Vesikeln ablaufen kann, bedarf es während des Polarisierungsprozesses einer bemerkenswerten Reorganisation des Zytoskeletts (Abb. 1.2.). Im Gegensatz zu unpolaren Zellen (z.B. Fibroblasten-Zellen), in denen die Minus-Enden der Mikrotubuli am Zentrosom oder an einem Mikrotubuli organisierenden Zentrum (engl.: *microtubule organizing center*, MTOC) verankert sind und ihre dynamischen Plus-Enden sich zum Kortex der Zelle erstrecken, sind die Mehrzahl der Mikrotubuli in polaren Zellen parallel zur apiko-basolateralen Achse angeordnet. Ihre Minus-Enden sind dabei zur apikalen Membran und die Plus-Enden zur basolateralen Membran orientiert (Bré et al., 1987, 1990, 1991; Piperno et al., 1987; Bacallao et al., 1989; Pepperkok et al., 1990; Bulinski & Gundersen, 1991). Diese Mikrotubuli liegen ähnlich wie in anderen differenzierten Zellen

losgelöst vom Zentrosom vor (Keating & Borisy, 1999; Bartolini & Gundersen, 2006). Es wird angenommen, dass die Minus-Enden im apikalen Bereich der Zelle stabilisiert werden (Toya & Takeich, 2016; Muroyama & Lechler, 2017). Der genaue Mechanismus ist allerdings noch nicht eindeutig aufgeklärt. Sehr wohl ist aber bekannt, dass die Positionierung und die Erhaltung dieser nicht-zentrosomalen MTs unverzichtbar für die spezialisierte Funktion der Epithelzellen sind (Sato et al., 2013). Neben diesen vertikal verlaufenden Mikrotubuli existiert ein Netzwerk aus Mikrotubuli unterhalb der apikalen Zellmembran. Deren Nukleation findet am MTOC statt, wo sie verankert bleiben. Das dynamische Plus-Ende dieser Mikrotubuli ist dabei zur apikalen Membran ausgerichtet (Meads & Schroer, 1995; Jaulin et al., 2007).



**Abb. 1.2. Organisation der Mikrotubuli in Abhängigkeit der Polarität einer Epithelzelle**

**Links:** Ohne Zell-Zell-Kontakte und abgegrenzte Membrandomänen ist das Zytoskelett ähnlich wie in Fibroblasten organisiert. Dabei sind die Mikrotubuli in unpolaren Zellen mit ihrem Plus-Ende zur Plasmamembran orientiert. **Rechts:** Nach der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und der Differenzierung zur polaren Zelle sind lange Mikrotubuli-Bündel parallel zur lateralen Membran mit ihrem Plus-Ende zur basalen Membran orientiert. Außerdem besitzt eine polare Epithelzelle eine kleine Population an Mikrotubuli, die mit ihrem Plus-Ende zur apikalen Membran ausgerichtet sind (modifiziert nach Yeaman et al., 1999).

Basierend auf der Umstrukturierung des Mikrotubuli-Netzwerks, welche durch die Ausbildung der Polarität bedingt ist, und den daraus resultierenden Mikrotubuli-Populationen ist eine gerichtete Verteilung von Vesikeln und Proteinen zur jeweiligen Membrandomäne möglich. Diese spezialisierte Organisation der Mikrotubuli spiegelt deutlich die Komplexität der intrazellulären Transportmaschinerie in polaren Zellen wieder (Müsch, 2004). Allerdings ist nicht nur das Mikrotubuli-Netzwerk, sondern auch das Aktin-Zytoskelett für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Polarität von großer Bedeutung. Aktin-Filamente bilden eine Schicht unterhalb der Zellmembran in sowohl unpolaren Zellen als auch in polaren Epithelzellen aus. Diese besitzen außerdem ein

dichtes, hochorganisiertes Aktin-Netzwerk, das unterhalb des apikalen Zellpols zu finden ist (Willenborg & Prekeris, 2011; Ross & Pawlina, 2011). Die Integrität dieses Netzwerks aus F-Aktin ist Voraussetzung für die erfolgreiche Protein- und Lipidverteilung zur apikalen Membran (Delacour & Jacob, 2006). Veränderungen im Aktin-Zytoskelett haben eine Aufhebung des Transports einiger Proteine, wie der SI (Jacob et al., 2003) oder des plg-R (Maples et al., 1997) zur Folge.

### **1.3. Mx1 - eine neue Komponente im apikalen Proteintransport**

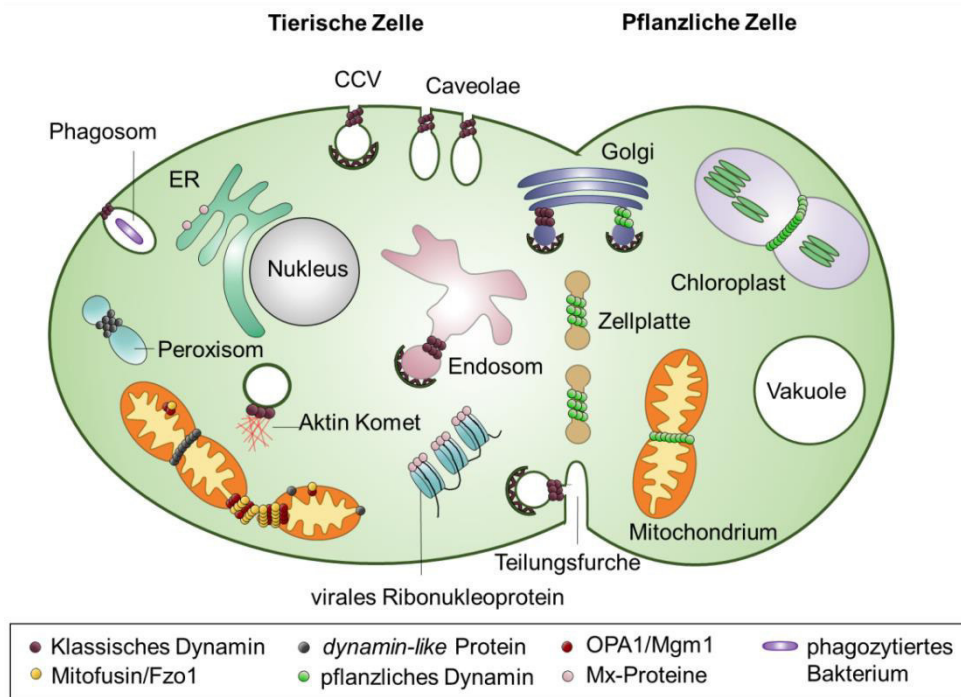
Um weitere Vesikelkomponenten des apikalen Proteintransports zu ermitteln, wurden p75<sup>NTR</sup>-tragende post-Golgi Vesikel aus der Zelle isoliert und ihre Lipid- und Proteinzusammensetzung analysiert. Dabei wurden neben Zytoskelett-Elementen und verschiedenen Rab-Proteinen, die große GTPase *Myxovirus Resistance Protein 1* (Mx1) als Bestandteil von apikalen post-Golgi Vesikeln identifiziert. Ebenfalls konnte herausgefunden werden, dass Mx1 *Lipid Raft*-unabhängig transportiert wird, da es sich auf LPH-positiven Vesikeln nachweisen ließ (Greb, 2011; Hoff et al., 2014).

#### **1.3.1. Die Dynamin-Superfamilie der großen GTPasen**

Mx-Proteine gehören zur Dynamin-Superfamilie der großen GTPasen. Die Mitglieder dieser Superfamilie sind in der Lage durch die Hydrolyse von Guanosintriphosphat (GTP) ihre spezifische biologische Funktion innerhalb der Zelle auszuüben (Bourne et al., 1990). Die GTPasen der Dynamin-Superfamilie bilden eine Gruppe von Proteinen, die sich in ihrer Struktur und ihren biochemischen Eigenschaften ähneln. Dazu zählen zahlreiche Proteine, darunter die klassischen Dynamine, Dynamin-verwandte Proteine (*dynamin-like proteins*, DLPs), OPA1 (*Optic Atrophy 1*), Mx-Proteine, Mitofusine und Guanylat-bindende Proteine (GBPs) und Atlastine (Praefcke & McMahon, 2004; Ramachandran & Schmid, 2018). Die Besonderheit dieser Proteine liegt in ihrer Fähigkeit die GTPase-Aktivität durch Selbstassemblierung zu stimulieren. Sie sind außerdem in der Lage Membranen umzuformen und können so an verschiedenen essentiellen, zellulären Prozessen und der Umstrukturierung von Kompartimenten beteiligt sein. Diese Proteine werden daher auch als mechano-chemische Enzyme betrachtet (Danino & Hinshaw, 2001; Daumke & Praefcke, 2016) und sind für den intrazellulären Vesikeltransport zwischen Zellkompartimenten wichtige Proteine. Denn durch ihre Eigenschaften ermöglichen sie die Vesikelknospung und das Abschnüren des Vesikels von der Membran. Beteiligt sind sie z.B. an der Abschnürung von Clathrin-umhüllten Vesikeln, von Caveolae, Phagosomen und Mitochondrien. Zusätzlich können sie an der Teilung und Fusion von Zellorganellen (Mitochondrien, Chloroplasten), an der Endozytose und an der Zytokinese beteiligt sein (Praefcke & McMahon, 2004). Zwei



Familien, nämlich Mx-Proteine und GBPs, sind Interferon (IFN) induzierte Proteine, die an der Immunabwehr verschiedener Pathogene, darunter vor allem Viren, involviert sind (Abb. 1.3.) (Haller & Kochs, 2011; Nordmann et al., 2012; Kim et al., 2012; MacMicking, 2012).

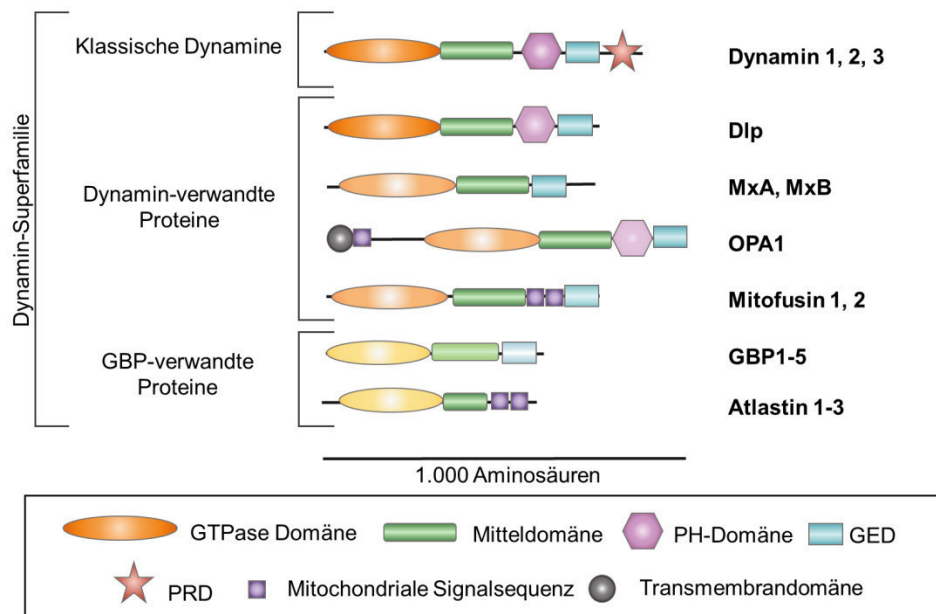


**Abb. 1.3. Lokalisierung und Funktion der Dynamin-Superfamilie Mitglieder**

Die klassischen Dynamine sowie die weiteren GTPasen der Dynamin-Superfamilie üben vielfältige Funktionen in sowohl tierischen als auch pflanzlichen Zellen aus. Dabei sind sie an unterschiedlichen, zellulären Prozessen beteiligt, bei denen es zur Reorganisation von Membranen und Umstrukturierung von Kompartimenten kommt. Dazu gehören z.B. die Reorganisation von Zellorganellen wie Mitochondrien, Peroxisomen und Chloroplasten sowie die Abschnürung von Vesikeln, wie Clathrin-umhüllten Vesikeln. Mx-Proteine sind am ER lokalisiert und interagieren mit viralen Ribonukleoproteinen. Eine wichtige Aufgabe dieser Proteine ist die Abwehr von Viren. Abkürzungen: OPA1: *optic atrophy 1*, Mgm1: *mitochondrial genome maintenance 1*, Fzo1: *fuzzy onions 1*, Mx: *myxovirus resistance protein* (modifiziert nach: Praefcke & McMahon, 2004).

Die Mitglieder der Dynamin-Superfamilie haben mehrere funktionale Domänen. Die minimale Domänenarchitektur, die alle Mitglieder gemeinsam haben, besteht aus einer konservierten G(TPase)-Domäne, einer Mitteldomäne und einer GTPase-Effektordomäne (GED) (Abb. 1.4.). Die N-terminale G-Domäne bindet und hydrolysiert GTP. Der konservierte Teil dieser Domäne von allen GTP-bindenden Proteinen besteht aus sechs  $\beta$ -Faltblättern, umgeben von fünf  $\alpha$ -Helices. Zusätzlich zeigt sie GTPase-Domäne eine verwandte Struktur zur minimalen G-Domäne von Ras-Proteinen. Die jeweiligen biochemischen Eigenschaften und biologischen Funktionen der großen GTPasen werden durch Insertionen in der G-Domäne beeinflusst (Praefcke & McMahon, 2004; Vetter & Wittinghofer, 2001; Niemann et al., 2001). Die Mitteldomäne sowie die GED dienen der Selbstassemblierung und der Regulation der GTPase-Aktivität. Außerdem besitzen einige Proteine der Superfamilie weitere Domänen. Manche

Familienmitglieder verfügen über Transmembrandomänen (z.B. Atlastine) oder Signalsequenzen (z.B. OPA1), wodurch die Proteine an den jeweiligen Wirkungsort bzw. zum Organell (z.B. Mitochondrien) innerhalb der Zelle rekrutiert werden, damit sie dort ihre Funktion ausüben (Praefcke & McMahon, 2004).



**Abb. 1.4. Domänenarchitektur der humanen GTPasen der Dynamin-Superfamilie**

Die Domänen sind in unterschiedlichen Formen und Farben dargestellt. Die schwächer werdende Farbintensität gibt die abfallende Sequenzhomologie zu Dynamin wieder. Alle Mitglieder der Dynamin-Superfamilie besitzen eine GTPase-Domäne, eine Mitteldomäne und, mit Ausnahme von Atlastin, eine GTPase-Effektor-Domäne (GED). Einige der großen GTPasen enthalten zusätzlich eine Domäne zur Interaktion mit Lipiden z.B. eine Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne oder eine Transmembrandomäne. Die klassischen Dynamine besitzen darüber hinaus noch eine C-terminale Prolin-reiche-Domäne (PRD) zur Interaktion mit anderen Proteinen. OPA1 besitzt eine mitochondriale Signalsequenz. Dlp: *dynamin-like protein*, Mx: *myxovirus resistance protein*, OPA1: *optic atrophy 1*, GBP: *guanylate-binding protein* (modifiziert nach Praefcke & McMahon, 2004).

Die klassischen Dynamine besitzen zusätzlich zur minimalen Domänenarchitektur eine Prolin-reiche-Domäne (PRD), mit deren Hilfe die Interaktionen mit Proteinen vermittelt werden. Die PRD enthält ein PxxP Aminosäuremotiv das mit Proteinen, die eine SH3-Domäne besitzen, interagiert, um Dynamin an den Wirkungsort zu rekrutieren und die Funktion von Dynamin mit anderen Faktoren zu koordinieren. Diese Proteine enthalten auch eine Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne für die Bindung an negativ geladene Membranen. Eine Gemeinsamkeit aller Mitglieder ist die Fähigkeit Membranen zu binden. Allerdings besitzen nicht alle großen GTPasen eine solche PH-Domäne, sind aber trotzdem in der Lage *in vitro* an Membranen oder Liposomen zu binden (Smirnova, et al., 2001; Yoon et al., 2001) und sie sogar zu tubulieren (Accola et al., 2002). Verantwortlich ist dafür ein Bereich zwischen der Mitteldomäne und der GED (Praefcke & McMahon, 2004). Die großen GTPasen haben einige weitere, charakteristische Eigenschaften, wodurch sie sich im Wesentlichen von anderen G-Proteinen

unterscheiden. Die Mitglieder der Dynamin-Superfamilie haben ein größeres Molekulargewicht (>70 kDa bis ~100 kDa). Des Weiteren besitzen sie eine größere G-Domäne (~300 Aminosäuren) im Vergleich zu Ras-Proteinen (~170 Aminosäuren) (Praefcke & McMahon, 2004; Daumke & Praefcke, 2016). Auch weisen die großen GTPasen der Dynamin-Superfamilie eine geringe Affinität für Guanin-Nukleotide (GTP und GDP) auf, sind in deren Abwesenheit stabil und haben außerdem eine hohe intrinsische GTPase-Aktivität. Eine weitere Gemeinsamkeit der Mitglieder der Dynamin-Superfamilie ist die Fähigkeit die GTPase-Aktivität durch Selbstassemblierung zu stimulieren (Praefcke & McMahon, 2004; Chappie & Dyda 2013). Die Oligomerisierung und die Bindung an Membranen stimuliert die basale GTP-Hydrolyserate um mehr als das 200-fache (Ramachandran & Schmid, 2018). Durch die Dimerisierung wird die GTPase-Aktivität induziert, was eine Konformationsänderung auslöst. Diese wird von der G-Domäne auf die angrenzenden helikalen Domänen übertragen. Veränderungen innerhalb des Oligomers und die aus der GTP Hydrolyse gewonnenen Energie wird für die Membran-Deformierung genutzt (Daumke & Praefcke, 2016). Im Gegensatz zu kleinen GTPasen, benötigen die Mitglieder der Dynamin-Superfamilie keine GAPs (engl.: *GTPase-activating proteins*) für die effiziente GTP-Hydrolyse. Auch sind sie in der Lage den GTPase Zyklus ohne GEFs (engl.: *Guanine nucleotide exchange factors*) zu durchlaufen (Prakash et al., 2000; Praefcke & McMahon, 2004).

Der Namensgeber der Dynamin-Superfamilie ist das Dynamin-Protein. Dieses Protein wurde erstmals 1989 als Mikrotubuli-bindendes Protein im Kalbsgehirn beschrieben (Shpetner & Vallee, 1989). Sequenzierungsanalysen zeigten, dass die GTPase-Domäne dieses Proteins Homologien zu den Interferon-induzierten Mx-Proteinen sowie zu VSP1 (engl.: *vacuolar protein sorting*) aus der Hefe aufweist (Obar et al., 1990). Erkannt wurde die Bedeutung des Dynamin-Proteins bereits 1973 durch Untersuchungen mit *Drosophila melanogaster*. Durch eine einzelne Mutation im Gen, welches für ein Dynamin-Homolog kodiert, führte zu einem temperatursensitiven Phänotyp. Bei nicht-permissiven Temperaturen zeigten die Fliegen eine vollständige, aber reversible Lähmung (Grigliatti et al., 1973). Dieses Gen wurde daher *shibire* genannt (japanisch für Taubheit). Die Ursachen für den beschriebenen Phänotyp fand man durch elektronenmikroskopische Analysen heraus. Es wurde gezeigt, dass neuromuskuläre Synapsen kaum Neurotransmitter-gefüllte Vesikel aufwiesen. Stattdessen akkumulierten Clathrin-umhüllte Membranbläschen (engl.: *clathrin coated pits*, CCP) an der neuronalen Plasmamembran (Kosaka & Ikeda, 1983; Koenig & Ikeda, 1989). Vermutet wurde, dass das *shibire* Protein eine aktive Rolle bei der Abschnürung der Vesikel spielt (Koenig & Ikeda, 1989). Später fand man durch Sequenzanalysen heraus, dass dieser Locus für das Dynamin-Protein in Säugetieren kodiert (van der Bliek

& Meyerowitz, 1991; Chen et al., 1991). Säugetiere besitzen drei Dynamin-Isoformen (Cao et al., 1998) mit einem distinkten Expressionsmuster in verschiedenen Geweben (Ferguson & Camilli, 2012). Dynamin-2 wird ubiquitär exprimiert und ist als einziges Dynamin in Epithelzellen vorhanden (Chua et al., 2009; González-Jamett et al., 2013).

Die Anordnung von Dynamin in helikale Strukturen um den Hals von CCPs und seine Funktion bei der Abschnürung von Clathrin-umhüllten Vesikeln von der Plasmamembran während der Endozytose ist bereits gut beschrieben. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Membranen, durch die Zugabe von isoliertem Dynamin in Anwesenheit eines nicht hydrolysierbaren GTP-Analogons, *in vitro* tubuliert werden. Dabei bildet Dynamin helikale Strukturen um die länglichen Membranen. In Anwesenheit von GTP können diese fragmentiert werden (Hinshaw & Schmid, 1995). Es gibt verschiedene Modelle, welche die mögliche Wirkungsweise von Dynamin beschreiben. Allen Modellen ist gemeinsam, dass für den Prozess der Endozytose und für das Abschnüren eines CCV weitere Faktoren, die eine unterstützende oder regulatorische Rolle übernehmen, benötigt werden (Ferguson & Camilli, 2012). Dazu zählen eine Reihe von Gerüstproteinen, Clathrin Adapterproteine sowie Proteine, die eine BAR-Domäne besitzen. Diese Proteine lagern sich am entstehenden Vesikel an und stabilisieren die Membrankrümmung (Ferguson & Camilli, 2012; McMahon & Boucrot, 2011; Traub, 2009). Des Weiteren ist Aktin eine wichtige Komponente bei der Abschnürung von Vesikeln. Zunächst werden das Aktin-regulierende Proteine N-WASP (engl.: *neural Wiskott–Aldrich syndrome protein*) und der Aktin-Nukleator Arp2/3 (engl.: *actin-related proteins2/3*)-Komplex an das Clathrin Netzwerk rekrutiert. Während der Clathrin-vermittelten Endozytose liefert das Aktin-Zytoskelett zusätzliche Funktionalität in Form von Energie für die Vesikelknospung und -abschnürung (McMahon & Boucrot, 2011; Ferguson & Camilli, 2012). Neben der Funktion von Dynamin als bedeutungsvolle Komponente bei der Abschnürung von CCVs, ist dieses Protein auch an der Abschnürung von Caveolae an der Plasmamembran involviert (Henley et al., 1998, Praefcke & McMahon, 2004). Dynamin-2 ist außerdem in der Lage die epitheliale Morphogenese zu regulieren, da Dynamin-2 sowohl die Assemblierung von Aktin-Filamenten steuert als auch Membranen umformen kann (Chua et al., 2009). Zudem wurde auch herausgefunden, dass Dynamin in intrazellulären Transportvorgängen eine entscheidende Rolle einnimmt (Kreitzer et al., 2000; Cao et al., 2000).

Viele Mechanismen des intrazellulären Proteintransports sind bereits gut beschrieben. Die Sortierung aber auch der Transport von Proteinen und Lipiden zu ihren spezifischen Kompartimenten, Membranbereichen oder Organellen ist allerdings ein komplexer Prozess. Im Interesse der Wissenschaft liegt es deshalb, die einzelnen

Schritte des intrazellulären Proteintransports vollständig aufzuklären und alle beteiligten Komponenten zu identifizieren.

### 1.3.2. Mx-Proteine

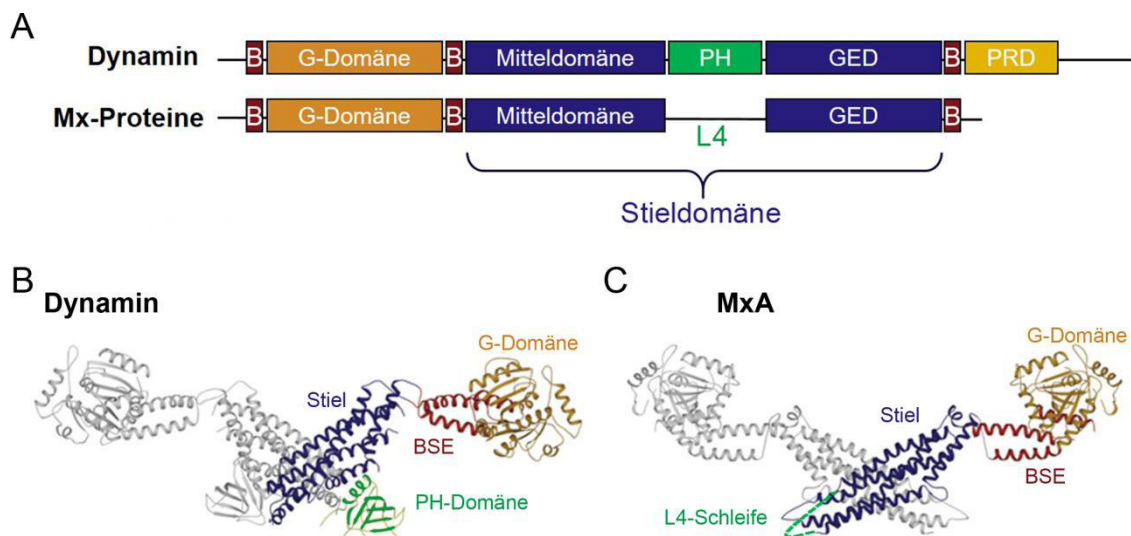
Mx-Proteine innerhalb der Dynamin-Superfamilie eine Sonderstellung ein. Ursprünglich wurden sie als Proteine mit einer antiviralen Aktivität entdeckt. 1962 machte Lindenmann die zufällige Entdeckung, dass Mäuse des Inzuchtstammes A2G eine Resistenz gegenüber des Influenza-A-Virus (FLUAV) aufweisen. Die experimentelle Infektion mit einer normal letalen Dosis verlief bei den A2G-Mäusen im Gegensatz zu den übrigen Laborstämmen nicht tödlich (Lindenmann, 1962). Zurückzuführen ließ sich diese Resistenz auf ein autosomal dominant vererbtes Gen auf Chromosom 16 (Haller et al., 1987). Dieses Gen verleiht eine spezifische Resistenz gegen Orthomyxoviren und wurde aus diesem Grund als *Myxovirus resistance* (Mx)-Gen bezeichnet (Lindenmann, 1964). In den meisten Laborstämmen weist das Mx1-Gen Deletionen oder Mutationen auf, wodurch die Resistenz verloren geht. Bei der Wildtierpopulation und manchen davon abstammenden Labormäusen ist das Gen jedoch noch intakt (Haller et al., 1987; Staeheli et al., 1988). Ende der siebziger Jahre wurde dann festgestellt, dass der durch Mx1 vermittelte Resistenzphänotyp vom Typ-I IFN abhängig ist (Haller et al., 1979).

Das murine Mx1-Gen befindet sich auf Chromosom 16. Am selben Genort wurde später ein zweites Mx-Gen, das die Bezeichnung Mx2 erhalten hat, entdeckt (Staeheli & Sutcliffe, 1988). Die Gene für die Mx-Proteine sind in Vertebraten hochkonserviert und es wurden auch Gene in Säugern, Vögeln und Fischen nachgewiesen (MacMicking, 2004; Haller et al., 2015). In den meisten Fällen wurden mindestens zwei Gene identifiziert (Haller et al., 2007a), das Genom der Ratte beispielsweise enthält drei Mx-Gene (Sandrock et al., 2001). Zwei Mx-Proteine konnten beim Menschen identifiziert werden, die auf Chromosom 21 kodiert sind, das Homolog zum murinen Chromosom 16. Die beiden Mx-Proteine werden als MxA und MxB bezeichnet (Haller et al., 2015). Bis auf das murine Mx1, das eine C-terminale Kernlokalisierungssequenz (engl.: *nuclear localization signal*, NLS) besitzt (Noteborn et al., 1987), und das humane MxB, welches eine N-terminale NLS aufweist (Melén et al., 1996), akkumulieren die Mx-Proteine aller Vertebraten im Zytoplasma. Mittlerweile ist bekannt, dass Mx-Proteine nicht nur eine antivirale Aktivität gegen Influenza A sondern auch gegen eine Vielzahl verschiedener RNA- und DNA-Viren besitzen. Der genaue Mechanismus ist allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt (zur Übersicht: Verhelst et al., 2013; Haller et al., 2015). Vermutlich beeinträchtigen Mx-Proteine die intrazelluläre Verteilung der viralen Komponenten. Die antivirale Aktivität von MxA wird dabei durch dessen subzelluläre Lokalisation beeinflusst (Haller et al., 2007a; Haller et al., 2015).

Die Expression der Mx1 ist streng durch Typ I ( $\alpha/\beta$ ) und Typ III Interferone reguliert und Mx1 zählt daher zu den Interferon-stimulierten Genen (ISG) (Haller et al., 2007a). Mx-Proteine sind in nicht-infizierten Zellen abwesend, akkumulieren aber nach einer Virusinfektion innerhalb der Zellen aufgrund der Induktion der Expression durch Interferone (Pitossi et al., 1993). Allerdings wurde mittlerweile gezeigt, dass Mx-Proteine trotz der strikten Regulation durch Interferone in manchen Zelllinien endogen exprimiert werden. Mx1 wird beispielsweise in der Gebärmutterschleimhaut von Schafen konstitutiv exprimiert und wird dabei von Steroidhormonen reguliert (Ott et al., 1998). Auch humanes MxB ist in HeLa-Zellen konstitutiv vorhanden (King et al., 2004). Außerdem exprimieren sowohl ovine Drüsenepithelzellen (Racicot & Ott, 2011) als auch die MDCK-Epithelzelllinie Mx1 ohne eine Interferoninduktion oder Virusinfektion (Nakamura et al., 2005). Erstaunlicherweise zeigt das canine Mx1 in MDCK-Zellen keine Aktivität gegen Influenza-Viren (Seitz et al., 2010). Dies deutet auf eine weitere Funktion der großen GTPase in MDCK-Zellen hin. Mittlerweile wurden neben der antiviralen Aktivität von Mx1 auch andere Funktionen beschrieben. Mx-Proteine nehmen eine wichtige Rolle bei verschiedenen intrazellulären Transportmechanismen ein. Porcines Mx1 verhindert die Endozytose von Influenza A Viruspartikeln an der Plasmamembran (Palm et al., 2010) und die Überexpression von MxA führt zu einem gestörten Transport von internalisiertem Transferrin. Dies führt zur Akkumulation dieses Proteins, was für ein Blockieren des Transferrin-Recyclings spricht. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass MxA mit Dynamin assoziieren kann (Jatiani & Mittal, 2004). In der Literatur ist auch beschrieben, dass ovines Mx1 auf unkonventionellem Weg sekretiert wird und ein potentieller Regulator dieses Prozesses sein könnte (Toyokawa et al., 2007a, 2007b). Darüber hinaus wurde ovines Mx1 auf Exosomen identifiziert (Racicot et al., 2012). Außerdem wurde gezeigt, dass MxB den Import in den Nukleus reguliert (King et al., 2004). Auch das canine Mx1 scheint eine Rolle im intrazellulären Proteintransport zu besitzen. Diesem Protein wurde eine Funktion als Komponente im *Lipid Raft*-unabhängigen Proteintransport zugeschrieben (Hoff et al., 2014). Mx-Proteine, die keine Aktivität gegen Viren zeigen, wie zum Beispiel Mx3 der Ratte sowie Mx-Proteine der Ente, sind weitere Hinweise, dass Mx-Proteine zelluläre Funktionen übernehmen (Sandrock et al., 2001; Bazzigher et al., 1993). Neben der Interferonantwort kann aufgrund der Strukturähnlichkeit zu Dynamin auf die Bedeutung von Mx-Proteinen bei zellulären Aufgaben innerhalb der Zelle geschlossen werden.

Mx-Proteine weisen ein Molekulargewicht von ungefähr 75 kDa auf und besitzen wie die anderen Mitglieder der Dynamin-Superfamilie eine N-terminale GTPase-Domäne, eine Mitteldomäne und eine C-terminale GTPase-Effektordomäne (Abb. 1.5. A). Innerhalb der G-Domäne befindet sich eine funktionell wichtige Region, die sogenannte

*self-assembly sequence* (Nakayama et al., 1993). Die Mitteldomäne, auch zentrale Interaktionsdomäne (engl.: *central interactive domain*) genannt, und GED, die eine Leucin-Zipper-Domäne enthält, sind entscheidend für die Konformation sowie Aktivität der Mx-Proteine. Die Struktur von Dynamin und humanem MxA wurde bereits kristallographisch aufgeklärt. Sie zeigt eine dreidimensionale Anordnung der Domänen, die charakteristisch für große GTPasen der Dynamin-Superfamilie ist (Abb. 1.5. B und C) (Gao et al., 2011; Faelber et al., 2013). Dynamin weist eine vergleichbare Kristallstruktur auf (Faelber et al., 2011). Die linearen Domänenstrukturen von Mx1 und Dynamin unterscheiden sich stark von ihren jeweiligen Kristallstrukturen. Der Grund liegt in Strukturelementen, die für die Verbindung der einzelnen Domänen verantwortlich sind. Zwei Gelenke (*hinge* 1 und 2) erlauben eine strukturelle Flexibilität und ermöglichen Konformationsänderungen während der GTP-Hydrolyse (Chappie & Dyda, 2013). Für Dynamin und die Mx-Proteine wurden das Bündelsignalelement (engl.: *bundle-signaling element*, *BSE*) und die Stieldomäne als weitere, wichtige Strukturelemente beschrieben, die für die Verbindung der einzelnen Domänen verantwortlich sind.



**Abb. 1.5. Struktur des humanen MxA**

**(A)** Domänenstruktur von Dynamin und MxA. Beide Proteine enthalten eine N-terminale G(TPase)-Domäne, eine Mitteldomäne sowie eine C-terminale GTPase-Effektordomäne (GED). Außerdem enthalten die beiden Proteine Bündelsignalelemente (BSE), markiert durch den Buchstaben B. Die Mitteldomäne bildet zusammen mit der GED die Stieldomäne. Dynamin enthält außerdem eine PH- und eine PRD-Domäne. Mx-Proteine besitzen zur Membranbindung eine L4, Schleife, die sich an der gleichen Position wie die PH-Domäne im Dynamin-Protein. Kristallstruktur eines Dynamin-Dimers (PDB 3SNH) **(B)** und eines humanen MxA-Dimers (3SZR) **(C)**. Der Farbcode entspricht der Domänenstruktur wie in **A** (modifiziert nach Faelber et al., 2013).

Das BSE, das sich aus drei  $\alpha$ -Helices zusammensetzt, ist für die flexible Konformationsänderung des Proteins bei der GTP Hydrolyse verantwortlich und verbindet so die GTPase-Domäne mit der Stieldomäne. Dies ist für die relative Orientierung dieser Domänen zueinander und die Signalübertragung von der GED zur GTPase-Domäne entscheidend (Chappie et al., 2009, 2010; Chappie & Dyda, 2013). Es

konnte gezeigt werden, dass die GED auch als eigenes, intramolekulares GAP fungiert (Sever et al., 1999). Die Stieldomäne, ein langes Bündel aus vier Helices, die eine Vier-Helix-Bündel Faltung zeigen, setzt sich aus der Mitteldomäne und der GED zusammen und vermittelt die Assemblierung zu Dimeren. Durch die Interaktion der Stieldomäne und des BSE benachbarter Proteine können diese Dimere weiter zu multimeren Proteinen und Ringstrukturen oligomerisieren (Gao et al., 2010; Gao et al., 2011; Faelber et al., 2011). Die Bildung von regelmäßigen Oligomeren ist eine gemeinsame Eigenschaft der Dynamin-Superfamilie und wurde für humanes MxA bereits gezeigt (Haller & Kochs, 2002; Accola et al., 2002). Die Stieldomäne mehrere Mx-Proteine ordnen sich dabei in einem zaunartigen Muster an. Mx1 liegt in Lösung bei niedriger Proteinkonzentration und physiologischer Salzkonzentration als Tetramer vor. Bei höheren Proteinkonzentrationen oligomerisiert Mx1 weiter zu langen Filamenten und ordnet sich in Ringen an (Verhelst et al., 2013).

Anders als klassische Dynamine besitzen Mx-Proteine keine PH-Domäne oder PRD. Für Mx1 konnte allerdings gezeigt werden, dass es mit intrazellulären Membranen assoziieren kann. Die Bindung von Mx1 an negativ geladene Membranen wird durch eine Schleife vermittelt, die aus vier Lysinen besteht. Diese L4-Schleife befindet sich an der Spitze der Stieldomäne und liegt gegenüber der GTPase-Domäne. Die Bindung von MxA erfolgt mit Hilfe dieser positiv geladenen Lysine, vorzugsweise an negativ geladene Phospholipide (von der Malsburg et al., 2011). Die L4-Schleife befindet sich interessanterweise an der gleichen Position wie die PH-Domäne im Dynamin-Protein (Faelber et al., 2013). Warum Mx1 mit Membranen assoziiert, ist noch nicht aufgeklärt. Es wird vermutet, dass dadurch Viren inhibiert werden, die für die Replikation Membranen benötigen (Reichelt et al., 2004; Netherton et al., 2009; Johnston et al., 2012; Haller et al., 2015). Möglich ist auch, dass Oligomere eine vor dem Abbau geschützte Speicherform darstellen (Haller & Kochs, 2002). Allerdings ist auch denkbar, dass Mx-Proteine andere Aufgaben als die antivirale Aktivität einnehmen. Innerhalb der Zelle ist Mx1 ähnlich wie Dynamin in der Lage negative Membranen zu binden und ringförmige Oligomere zu bilden, wodurch Liposomen tubuliert werden (Accola et al., 2002; von der Malsburg et al., 2011). Für humanes MxA wurde bereits gezeigt, dass es sich teilweise an Membranen des zwischen ER und Golgi befindlichen Intermediärkompartiments befindet (Accola et al., 2002; Stertz et al., 2006).



## 1.4. Das Tubulin-Zytoskelett

### 1.4.1. Aufbau und Eigenschaften von Mikrotubuli

Mikrotubuli sind hohlzylindrische Polymere, die innerhalb der Zellen ein Filamentsystem ausbilden. Sie stellen die größte Komponente des eukaryotischen Zytoskeletts dar. MTs sind strukturelle sowie funktionelle wichtige Komponenten für jede Zelle, da sie an einer Vielzahl von Funktionen beteiligt sind. Dazu zählen die Zellteilung, die Zellmigration oder die Zelldifferenzierung. Außerdem sind Mikrotubuli für die Anordnung von Zellorganellen essentiell oder dienen als Transportweg für die Beförderung von Vesikeln (Jacob et al., 2003; Gadadhar et al., 2017; Brouhard & Rice, 2018). Aufgebaut aus stabilen  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimeren formen MTs lange Protofilamente, indem die  $\alpha$ -Tubulin Untereinheit eines Heterodimers an die  $\beta$ -Tubulin Untereinheit eines weiteren Heterodimers bindet (*head-to-tail* Anordnung) (Amos & Klug, 1974). Durch die laterale Zusammenlagerung weiterer Protofilamente wird eine tubuläre Struktur, ein Mikrotubulus, aus insgesamt 13 linearen Protofilamenten mit einem Durchmesser von ca. 25 Nanometer gebildet (Evans et al., 1985; Janke, 2014; Goodson & Jonasson, 2018).

Mikrotubuli sind sehr dynamische Strukturen, die einem ständigen Wechsel aus Phasen der Polymerisation und Depolymerisation unterworfen sind. Dies wird als dynamische Instabilität bezeichnet (Mitchison & Kirschner, 1984). Für den Prozess der Polymerisierung bindet jedes  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimer zwei GTPs. Während das am  $\alpha$ -Tubulin befindliche GTP irreversibel gebunden bleibt und nicht hydrolysiert wird, wird das an die  $\beta$ -Untereinheiten gebundene GTP bei der Tubulin-Polymerisierung kurz nach dem Einbau der Untereinheit in einen Mikrotubulus reversibel zu Guanosindiphosphat (GDP) hydrolysiert (Howard & Hyman, 2003). Die Verlängerung der MTs erfolgt durch das Anfügen von GTP-haltigen  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Dimeren an das Plus-Ende des Mikrotubulus. Daraus entsteht die sogenannte GTP-Kappe am wachsenden Ende des Mikrotubulus, welches vor der Depolymerisation schützt und Stabilität verleiht (Carlier & Pantaloni, 1981; Brouhard & Sept, 2012). Solange ein Mikrotubulus eine solche GTP-Kappe besitzt, ist es in der Lage zu wachsen. Kommt es zum spontanen Übergang zur Depolymerisierung wird dies als Katastrophe bezeichnet. Der Wechsel von Depolymerisation zu MT-Wachstum hingegen wird als Rettung bezeichnet (Mitchison & Kirschner 1984; Goodson & Jonasson, 2018). Die Polymerisation hängt von verschiedenen Bedingungen ab. Zum einen ist die Konzentration der Tubulin-Dimere entscheidend (Binder et al., 1975, Erickson & O'Brien, 1992). Außerdem spielt die Temperatur für die Stabilität der meisten Mikrotubuli eine wichtige Rolle. Bei 4°C depolymerisieren aufgereinigte Mikrotubuli in  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Untereinheiten. Durch die Erwärmung auf 37°C kommt es zu einer Polymerisation der löslichen Tubulin-Dimeren

zu Tubulin-Strängen. Jedes entstehende Polymer besitzt durch den gerichteten Einbau der  $\alpha$ -/ $\beta$ -Tubulin-Heterodimeren eine intrinsische Polarität, mit einem schnell wachsenden Plus-Ende und einem weniger dynamischen Minus-Ende (Wade & Hymann, 1997). Dabei ist das  $\alpha$ -Tubulin zum Minus-Ende der MTs orientiert und  $\beta$ -Tubulin zum Plus-Ende (Desai & Mitchison, 1997). Das Minus-Ende der MTs wird meist am MTOC stabilisiert (Bergen & Borisy, 1980). Von dort aus beginnt auch die Nukleation der Mikrotubuli. Das  $\gamma$ -Tubulin, eine dritte bekannte Tubulin-Isoform, unterstützt als Polymerisationskern das Wachstum der  $\alpha$ -/ $\beta$ -Untereinheiten (Zheng et al., 1995; Moritz et al., 1995). Differenzierte Zellen, wie z.B. polare Epithelzellen, besitzen daneben auch nicht-zentrosomale Mikrotubuli (Atkinson et al., 1992; Langford 1995; Sato et al., 2013). Die Polarität der MTs ist zentral für die Funktion von Mikrotubuli-assoziierten Motorproteinen, wie Kinesine (Vale & Fletterick, 1997) und Dyneine (Collins, 1994).

*In vivo* wird die dynamische Instabilität von verschiedenen Mikrotubuli assoziierten Proteinen (engl.: *microtubule associated proteins*, MAPs) reguliert (zur Übersicht siehe: Howard & Hyman, 2007; Akhmanova & Steinmetz, 2015). Die dynamische Instabilität ist für die Funktion von Mikrotubuli maßgeblich, beispielsweise für ihre Funktion als Transportweg, sowie für ihre räumliche Verteilung in der Zelle (Holy & Leibler, 1994). Durch die dynamische Instabilität der Mikrotubuli können außerdem Kräfte erzeugt werden, die denen von Motorproteinen sehr ähnlich sind (Dogterom & Yurke, 1997). Diese Kräfte können genutzt werden, um Chromosomen während der Mitose oder Vesikel zu verschieben. Auch Druck auf die Zellmembran kann ausgeübt werden (Laan et al., 2008; Inoué & Salmon, 1995; Mitchison & Kirschner 1984). Dies ist vor allem während der Zellmigration von großer Bedeutung (Etienne-Manneville, 2013; Brangwynne et al., 2007) (siehe Kapitel 1.5.) (Etienne-Manneville, 2013).

#### **1.4.2. Kinesine – Mikrotubuli-assoziierte Motorproteine**

Mikrotubuli-assoziierte Proteine werden je nach Lokalisation und Funktion in Gruppen unterteilt. Eine Gruppe von MAPs sind MT-assoziierte Motorproteine. Dabei handelt es sich generell um Enzyme, die chemische Energie in Form von ATP in die gerichtete Bewegung entlang von filamentösen Transportwegen umsetzen (Spudich, 1994; Titus & Gilbert, 1999). Ihre Funktion ist für eine Reihe von essentiellen zellulären Prozessen fundamental (Goldstein, 2001). Motorproteine werden in drei große Klassen unterteilt: Myosine sind Aktin-basierte Motorproteine, sowie Kinesine und Dyneine. Die letzten beiden Motorproteine binden an Mikrotubuli und übersetzen die chemische Energie aus der ATP-Hydrolyse in kinetische Energie, welche in Form von Bewegung entlang von Tubulin-Filamenten sichtbar wird. Dabei weisen sie eine einseitig orientierte Bewegung

auf, die in zwei verschiedene Transportrichtungen unterschieden werden kann. Der anterograde Transport ist zur Zellperipherie gerichtet, im Gegensatz dazu laufen beim retrograden Transport die Motoren in Richtung Zellkern. Basierend auf ihrer Laufrichtung, werden die Motorproteine allgemein als Minus-Ende (Dyneine) oder als Plus-Ende (Kinesine) gerichtete Motorproteine unterschieden (zur Übersicht siehe: Vallee et al., 2004; Hirokawa et al., 2009). Zu ihren Aufgaben zählt der Transport von RNAs sowie von Vesikeln und Organellen (Gagnon & Mowry, 2011). Seit der Entdeckung der Kinesine 1958 (Brady, 1985; Vale et al., 1985) konnten diesen Tubulin-Motoren zahlreiche biologische Funktionen im intrazellulären Transport wie auch bei der zellulären Morphogenese zugeschrieben werden. (Hirokawa & Noda, 2008).

Die Kinesin Superfamilie (KIFs) bildet neben Dynein die zweite große Gruppe von Mikrotubuli-assoziierten Motorproteinen, welche primär am intrazellulären Langstreckentransport involviert sind (Verhey et al., 2011). Kinesine weisen eine hohe Diversität auf. Im Jahr 2004 führte man eine einheitliche Nomenklatur für Kinesine ein (Lawrence et al., 2004), welche die KIFS in 14 unterschiedliche Kinesin-Familien unterteilt. Diese sind von Kinesin-1 bis Kinesin-14 (A/B) benannt. Kinesin-1, auch Kif5 oder konventionelles Kinesin genannt, ist das erste identifizierte Kinesin (Brady, 1985; Vale et al., 1985). Die Kinesin-1 Familie setzt sich aus den drei Subtypen von Kif5 zusammen, Kif5A, Kif5B und Kif5C, die eng miteinander verwandt sind (Lawrence et al., 2004). Kif5B wird ubiquitär exprimiert (Gudkov et al., 1994), dagegen ist die Expression von Kif5A und Kif5C spezifisch für Neuronen (Aizawa et al., 1992; Kanai et al., 2000). Kinesin-1 bildet ein Heterotetramer, bestehend aus zwei Kinesin-1 schweren Ketten (*Kinesin heavy chain*, KHC) für die Motoraktivität und zwei leichten Ketten (*Kinesin light chain*, KLC) für die Cargobindung (Bloom et al., 1988; Marx et al., 2009). Die KLC ist vor allem in der Bindung der zu transportierenden Zellbestandteile involviert und fungiert als physische Verbindung zwischen der KHC und seinem Cargo (Kamal & Goldstein, 2002). Die KHC, codiert durch die Kif5A, Kif5B und Kif5C Gene, besteht aus einer  $\alpha$ -helikalen Stiel-domäne, einer C-terminalen Schwanzdomäne sowie einer globulären Motordomäne.

Eine wichtige Eigenschaft von Kif5 ist die bevorzugte Bindung an sowie die Bewegung entlang von detyrosinierten Mikrotubuli (Liao & Gundersen, 1998; Dunn et al., 2008), denn die Detyrosinierung bewirkt vermutlich eine höhere Prozessivität des Motorproteins (Kaul et al., 2014). Die direkte Messung der Bindungsaffinität zeigte, dass Kinesine mit einer 2,8-fach höheren Affinität an detyrosiniertes Tubulin (detyr-Tubulin) binden als an tyrosiniertes Tubulin (Liao & Gundersen, 1998). Diese erhöhte Affinität zu detyrosinierten Mikrotubuli hat einen Einfluss auf den Langstreckentransport. Dadurch ist es möglich, dass Kif5 lange Strecken z.B. in Axonen zurücklegen kann (Magiera & Janke, 2014). Kinesin-1 übernimmt sowohl in Neuronen als auch in nicht-neuronalen

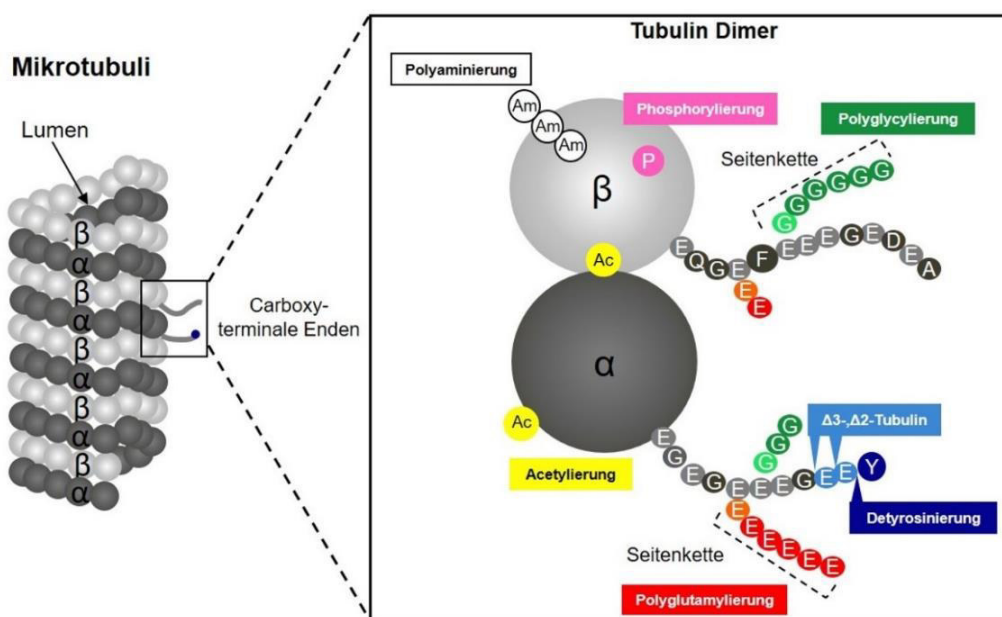
Zellen wichtige intrazelluläre Transportaufgaben. Es ist schon lange bekannt, dass Kinesin-1 an der retrograden Bewegung von Membranen zwischen Golgi und ER verwickelt ist (Lippincott-Schwartz et al., 1995). Neuere Studien zeigen auch, dass Kinesin-1 ebenfalls am anterograden Transport vom ER zum Golgi beteiligt ist und damit für die bidirektionale Motilität benötigt wird (Gupta et al., 2008). Allerdings gibt es auch eindeutige Hinweise darauf, dass diese Motorproteine, darunter Kif5B und Kif5C, wichtig für den anterograden Transport vom TGN zur Plasmamembran sind (Kreitzer et al., 2000; Nakagawa et al., 2000; Noda et al., 2001; Vale, 2003; Grigoriev et al., 2007; Jaulin et al., 2007; Hirokawa & Noda, 2008; Astanina & Jacob, 2010; Burgo et al., 2012). Es konnte gezeigt werden, dass der Transport des Neurotrophinrezeptor  $p75^{\text{NTR}}$  zur apikalen Plasmamembran abhängig von den beiden Tubulin-Motoren Kif5B und Kif5C ist (Jaulin et al., 2007; Astanina & Jacob, 2010). Die Expression von dominant-negativen Mutanten in MDCK-Zellen führt zu einem Defekt in der apikalen Verteilung von  $p75^{\text{NTR}}$ . Dieser Transport findet allerdings nur in polaren Epithelzellen statt (Jaulin et al., 2007). Kif5C konnte ebenfalls als Motorprotein für den sekretorischen Transport von post-Golgi Vesikeln identifiziert werden (Astanina & Jacob, 2010). Beide Proteine befördern die  $p75^{\text{NTR}}$ -tragenden Vesikel entlang von Mikrotubuli, die mit ihrem Plus-Ende zur apikalen Plasmamembran gerichtet sind (Jaulin et al., 2007; Astanina und Jacob, 2010). Die zahlreichen Studien deuten darauf hin, dass das Mikrotubuli-System und die Tubulin-Modifikationen sowie die Motorproteine zentrale Elemente der Transportmaschinerie sind (Müsch, 2004).

#### 1.4.3. Posttranslationale Modifikationen der Mikrotubuli

Eine besondere Herausforderung ist es, bedenkt man die hohe Konservierung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, zu verstehen, wie Mikrotubuli diese große Vielzahl an Funktionen ausüben können. Zahlreiche Proteine, die die Organisation und das dynamische Verhalten des Tubulin-Zytoskeletts beeinflussen können, sind mittlerweile identifiziert worden. So können Mikrotubuli funktionell auf bestimmte Aufgaben spezialisiert werden, indem sie mit verschiedenen MAPs interagieren. Diese Proteine können die Dynamik der Mikrotubuli durch die Stabilisierung oder die Destabilisierung regulieren oder sie mit anderen zellulären Strukturen, wie Membranen oder anderen Elemente des Zytoskeletts, verbinden. Zu weiteren Regulationsmöglichkeiten der Diversität von Mikrotubuli gehören sowohl der Einbau verschiedener  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Isoformen als auch eine Fülle an posttranslationalen Modifikationen (PTMs) der Tubulin-Untereinheiten. Zusammen werden die Isoformen und Modifikationen als „Tubulin-Code“ bezeichnet (Janke & Kneussel, 2010; Gadadhar et al., 2017; Nieuwenhuis & Brummelkamp, 2019). Zu den PTMs zählen verschiedene chemische Modifikationen. Diese sind die Acetylierung

(L'Hernault & Rosenbaum, 1985), die Glutamylierung und die Glycylierung (Eddé et al., 1990; Redeker et al., 1994) sowie die Detyrosinierung und die Tyrosinierung (Abb. 1.6.) (Barra et al., 1973; Arce et al., 1975).

Neben diesen gut beschriebenen PTMs gibt es noch weitere Modifikationen wie zum Beispiel die Phosphorylierung (Eipper, 1972), die Polyaminierung (Song et al., 2013), die Palmitoylierung (Caron, 1997) oder die Sumoylierung (Rosas-Acosta et al., 2005) (zu Übersicht siehe Janke & Bulinski, 2011). Das C-terminale Ende der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Untereinheiten ist dabei ein kritischer Punkt für die Regulation der MT-Dynamik durch PTMs. Obwohl die meisten Modifikationen dort stattfinden, gibt es auch wenige PTMs (Acetylierung, Phosphorylierung, Polyaminierung), die an der globulären Domäne der Moleküle zu finden sind. Posttranslationale Modifikationen sind entscheidende Faktoren, welche die Eigenschaften der Mikrotubuli beeinflussen. Dabei können PTMs allein oder in Kombination den Mikrotubuli spezifische Funktionen verleihen (Verhey & Gaertig, 2007; Janke, 2014).



**Abb. 1.6. Lokalisierung der posttranslationalen Modifikationen der Tubulin-Untereinheiten**

Mikrotubuli sind aus  $\alpha/\beta$ -Tubulin Dimeren aufgebaut, die einen hohlen Zylinder aus 13 Protofilamenten formen. Die C-Termini der Tubulin-Untereinheit ragen nach außen und sind so zugänglich für MAPs, Motorproteine sowie für modifizierende Enzyme. Die C-Termini der Monomere sind als Einbuchstabencode dargestellt. Posttranslationale Modifikationen sind an unterschiedlichen Regionen des Tubulin Dimers zu finden (modifiziert nach: Magiera & Janke, 2014).

Einige PTMs, wie zum Beispiel die Detyrosinierung und die Tyrosinierung am  $\alpha$ -Tubulin (Barra et al., 1973) sowie die (poly)-Glutamylierung und die (poly)-Glycylierung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin (Eddé et al., 1990; Redeker et al., 1992, 1994) wurden ursprünglich als Tubulin-Modifikation entdeckt. Mittlerweile konnten aber auch andere Proteine beschrieben werden, die glutamylert oder glycyliert sind (z.B. van Dijk et al., 2007). Allerdings gibt es bislang kein anderes Protein, welches tyrosiniert wird. Die

Tyrosinierung scheint also spezifisch für  $\alpha$ -Tubulin zu sein. Der Grund ist die einzigartige strukturelle Passform zwischen der Tubulin Tyrosin Ligase (TTL) und Tubulin (Prota et al., 2013).

#### 1.4.4. Die Tyrosinierung und Detyrosinierung von Mikrotubuli

Die erste entdeckte und eine der am besten charakterisierten Tubulin-Modifikation ist die Tyrosinierung bzw. Detyrosinierung. Bereits 1973 wurde das ATP-abhängige Anfügen eines Tyrosins an die  $\alpha$ -Tubulin-Untereinheit entdeckt (Barra et al., 1973). Im Jahr 1977 konnte gezeigt werden, dass diese Modifikation reversibel ist (Hallak et al., 1977), denn das Tyrosin kann nach Entfernung wieder an das Tubulin angefügt werden (Arce et al., 1975). Die meisten  $\alpha$ -Tubulin-Gene werden mit einem C-terminalen Tyrosin-Rest, der im Genom codiert ist, exprimiert (Valenzuela et al., 1981, Nieuwenhuis & Brummelkamp, 2019). In den letzten Jahrzehnten erlangte man ein besseres Verständnis über die Bedeutung des Tyrosinierungs/Detyrosinierungs-Zyklus, der in allen Zelltypen vorhanden ist (Bulinski et al., 1988). Erstaunlicherweise konnten erst vor kurzem die Enzyme, welche die Detyrosinierung katalysieren, identifiziert werden. Dabei handelt es sich um Proteine der Vasohibin (VASH)-Familie, die eine Carboxypeptidase Funktion besitzen und zusammen mit SVBP (engl.: *Small Vasohibin Binding Protein*) die Detyrosinierung des  $\alpha$ -Tubulins bewirken. Die VASHs entfernen das C-terminale Tyrosin, während SVBP als Chaperon wirkt (Aillaud et al., 2017; Nieuwenhuis et al., 2017). Diese Reaktion findet vorzugsweise in polymerisierten Mikrotubuli statt. Ähnlich wie acetyliertes Tubulin ist detyrosiniertes Tubulin in stabilen, langlebigen Mikrotubuli zu finden. Das resultierende detyrosinierte  $\alpha$ -Tubulin trägt nun als endständigen Rest ein Glutamat (Akhmanova & Maiato, 2017; Magiera & Janke, 2014). Im Gegensatz dazu ist die TTL, welche die umgekehrte Reaktion katalysiert, das erste identifizierte Tubulin-modifizierende Enzym gewesen (Murofushi, 1980; Schröder et al., 1985). Biochemische Studien und Strukturanalysen ergaben, dass TTL einen Komplex ausschließlich mit dem detyrosiniertem  $\alpha$ - $\beta$ -Tubulin-Heterodimer bildet und dieses modifiziert. Die Interaktion hängt dabei von der spezifischen Konformation des Dimers ab (Szyk et al., 2011, 2013; Prota et al., 2013). Die Affinität von TTL zu  $\alpha$ - $\beta$ -Tubulin Dimeren wird allerdings aufgehoben, wenn diese in Mikrotubuli eingebaut werden (Beltramo et al., 1987). Mikrotubuli entstehen folglich durch Polymerisation von  $\alpha$ - $\beta$ -Tubulin Dimeren, die entweder von depolymerisierenden Mikrotubuli oder aus der *de novo* Synthese entstammen. Nach der MT-Katastrophe können die  $\alpha$ - $\beta$ -Tubulin-Heterodimere erneut durch TTL tyrosiniert werden, wodurch neue Bausteine für eine weitere Runde der MT-Polymerisation bereitgestellt werden (Gundersen et al., 1987).

Detyrosiniertes Tubulin kann durch enzymatische Entfernung der vorletzten Glutaminsäure durch ein Protein aus der Familie der zytosolischen Carboxypeptidasen auch zu  $\Delta 2$ -Tubulin konvertiert werden. In Neuronen tritt die  $\Delta 2$ -Tubulin-Modifikation vor allem bei sehr stabilen MTs auf, die in der späten Phase des Maturierungsprozesses entstehen (Paturle-Lafanechère et al., 1994).  $\Delta 2$ -Tubulin ist kein Substrat für die Tyrosinierung durch TTL, weshalb der Prozess der  $\Delta 2$ -Tubulin-Bildung irreversibel ist (Paturle et al., 1989; Paturle-Lafanechère et al., 1991; Rüdiger et al., 1994). Demzufolge wird dadurch das  $\alpha$ -Tubulin aus dem Tyrosinierungs/Detyrosinierungs-Zyklus entfernt und der Status der Detyrosinierung blockiert, was zu einer permanenten Stabilisierung führt (Janke & Bulinski, 2011). Des Weiteren können zytosolischen Carboxypeptidasen eine weitere C-terminale Glutaminsäure entfernen, wodurch  $\Delta 3$ -Tubulin erzeugt wird (Berezniuk et al., 2012; Aillaud et al., 2016). Abhängig von der MT-Dynamik und der Gewebsspezifität ist ein einzelner Mikrotubulus aus tyrosiniertem Tubulin (tyr-Tubulin), detyrosiniertem Tubulin sowie  $\Delta 2$ -Tubulin (womöglich auch  $\Delta 3$ -Tubulin) zusammengesetzt (Paturle-Lafanechère et al., 1991; Webster et al., 1987a, b). Das spezifische Muster der PTMs sowie die Art der Modifikation sind entscheidend für die Funktion von Mikrotubuli. Das Muster kann sich dabei je nach Zelltyp, nach intrazellulärer Region oder und auch entlang desselben Mikrotubulus unterscheiden. Zink und Kollegen konnten beispielweise zeigen, dass entlang eines Mikrotubulus detyrosinierte Abschnitte von längeren tyr-positiven Segmenten unterbrochen werden. Auf diese Weise entsteht eine perlenschnurartige Verteilung der beiden Tubulin-Varianten, wobei es zur Bündelung von tyr-Tubulin am Ende des Tubulus kommt. Eine ähnliche Anordnung von detyr- und tyr-Tubulin konnte bei Mikrotubuli während der Interphase und Metaphase beobachtet werden (Geuens et al., 1986).

Generell wird die Detyrosinierung mit stabilen, langlebigen MT-Polymeren assoziiert, welche sich ähnlich wie acetylierte Mikrotubuli eine durch Resistenz gegen Nocodazol, ein Mikrotubuli-depolymerisierende Reagenz, auszeichnen. Dahingegen sind dynamische Mikrotubuli vorwiegend tyrosiniert (Geuens et al., 1986; Gundersen & Bulinski, 1986; Khawaja et al., 1988). Für stabile Mikrotubuli ist die Detyrosinierung von  $\alpha$ -Tubulin allein jedoch nicht ausreichend (Khawaja et al., 1988; Webster et al., 1990), denn die posttranslationalen Modifikationen beeinflussen und regulieren die Bindung verschiedener MAPs und Proteinkomplexe, die wiederum die Eigenschaften der MTs beeinflussen. Es gibt drei wichtige Klassen an MT-bindenden Proteinen, darunter MAPs, sowie +TIPs (engl.: *plus end tracking proteins*), die an das Plus-Ende der wachsenden Mikrotubuli binden. Zu der letzten Klasse gehören die Motorproteine, mit deren Hilfe Transportvesikel entlang von Mikrotubuli transportiert werden (Verhey & Gaertig, 2007). Es wurde herausgefunden, dass die Detyrosinierung zelluläre Mikrotubuli vor der

depolymerisierenden Aktivität der Mitgliedern der Kinesin-13 Familie schützt und dabei ihre Langlebigkeit erhöht (Peris et al., 2009; Sirajuddin et al., 2014). Außerdem binden Kinesin-1 Mitglieder bevorzugt an detyrosinierte Mikrotubuli (Liao & Gundersen, 1998; Kreitzer et al., 1999). Es hat sich herausgestellt, dass die Tyrosinierung ebenfalls essentiell für die Interaktion von Tubulin mit Proteinen, die eine CAP-Gly-Domäne (engl.: *cytoskeleton-associated protein-glycine-rich*) besitzen, ist (Badin-Larçon et al., 2004; Peris et al., 2006; Bieling et al., 2008; Akhmanova & Steinmetz, 2008).

Posttranslationale Modifikationen weisen folglich ein großes Spektrum an Möglichkeiten der Regulation auf, welche die Struktur und Stabilität von Mikrotubuli beeinflussen. Zudem nehmen sie einen Einfluss auf die MT-Bindungsaffinität von MAPs, einschließlich von Mikrotubuli-abhängigen Motorproteinen.

### 1.5. Bedeutung von Mikrotubuli bei der Zellmigration

In allen multizellulären Organismen ist die Zellmigration für zahlreiche biologische Prozesse ausschlaggebend. Während der Entwicklung finden zahlreiche dynamische Migrationsprozesse statt, bei denen große Gruppen an Zellen zur Bildung von Geweben und Organen sich in koordinierter Weise migrieren (Weijer, 2009). Aber auch im adulten Organismus hängen viele Vorgänge von der gerichteten Bewegung ab. Dies ist der Fall bei der Wundheilung, der Gewebserneuerung, der Immunantwort aber auch bei der Ausbreitung von Tumoren (Friedl & Gilmour, 2009; Bravo-Cordero et al., 2012). Generell versteht man unter Migration die aktive Fortbewegung von Zellen (zur Übersicht siehe: Pollard et al., 2000). Der Mechanismus besteht aus vier verschiedenen Schritten: der Ausbildung von Zellausläufern, der Ausbildung neuer Adhäsionskontakte, der Kontraktion des Zellkörpers und dem Ablösen des hinteren Zellenendes (Vicente-Manzanares et al., 2005; Etienne-Manneville, 2013). Eine wichtige Voraussetzung der Zellbewegung ist der koordinierte Ablauf dieser vier Schritte und die daraus resultierende asymmetrische Zellpolarisierung, bei der sich die Zellfront und das Zellende klar voneinander unterscheiden (Etienne-Manneville, 2013).

Die Zellausläufer an der Zellfront bestehen aus Lamellipodien, die durch Aktin-Polymerisation entstehen, sowie Filopodien, die mit langen Bündeln aus parallelen Aktin-Fasern aus der Membran ausgestülpt werden. Lamellipodien und Filopodien definieren die Zellfront und bestimmen die Migrationsrichtung (Mayor & Etienne-Manneville, 2016). Die Bewegung der Zelle wird allerdings erst durch ein koordiniertes Zusammenspiel von krafterzeugenden Zytoskelett-Elementen und kraftübertragenden Adhäsionsstrukturen möglich. Neben den fokalen Adhäsionen wird also auch das Zytoskelett für die Zellmigration benötigt (Etienne-Manneville, 2013). Es vermittelt den intrazellulären Transport, stabilisiert die Zelle in ihrer Form, verleiht ihr die nötige Plastizität und ist



ausschlaggebend für die mechanische Krafterzeugung. Denn die Entstehung von Zellausläufern erfordert eine vorantreibende Kraft, um die Plasmamembran voranzuschieben. Lange Zeit wurde angenommen, dass Aktin in den Filopodien und den Lamellipodien diese Kraft bereitstellt (Pollard & Borisy, 2003). Jedoch gibt es immer mehr Hinweise in der Literatur, die auf eine signifikante Rolle der Mikrotubuli in der Ausbildung der Ausläufer hindeuten. Tatsächlich sind Mikrotubuli wichtige Regulatoren für die polare Organisation wandernder Zellen. Seit Vasiliev und Kollegen (1970) nachweisen konnten, dass Mikrotubuli für die gerichtete Migration notwendig sind, häufen sich daher die Beweise für eine Beteiligung des Mikrotubuli-Systems.

Mikrotubuli besitzen die Fähigkeit einer hohen Drucklast zu widerstehen, was ihnen die Fähigkeit ermöglicht, die Form der Zelle zu kontrollieren (Brangwynne et al., 2007). Der Großteil der Mikrotubuli ist allerdings nicht in der Lage in Zellausläufer an der Zellfront vorzudringen, denn die Lamellipodien enthalten ein dichtes Aktin-Netzwerk. Außerdem erschwert der retrograde Aktinfluss das Eindringen der Mikrotubuli (Waterman-Storer & Salmon, 1997). Trotzdem gelingt dies wenigen Mikrotubuli, den sogenannten Pionier-Mikrotubuli, die bei der Ausbildung von Zellausläufern und in der Migration eine Rolle spielen. Mikrotubuli können dabei direkt durch ihre mechanischen Eigenschaften und durch ihren Beitrag am intrazellulären Transport mitwirken (Etienne-Manneville, 2013). Die MT-Polymerisation generiert dabei Kräfte von einigen Pikonewton, vergleichbar mit der Kraft, die von Motorproteinen erzeugt wird (Dogterom & Yurke 1997). Solche Kräfte, meistens von Mikrotubuli-Bündeln (Bradke & Dotti, 1999), werden genutzt, um die Plasmamembran während der Migration anzuschieben (Inoue & Salmon, 1995; Laan et al., 2008). Auch die Stabilität der Mikrotubuli ist bei der Ausbildung von Zellausläufern entscheidend. Bereits 1988 konnte Gundersen und Bulinski zeigen, dass die Detyrosinierung der  $\alpha$ -Tubulin-Untereinheit und die dadurch bedingte Stabilisierung der Mikrotubuli für die gerichtete Migration von großer Bedeutung sind. Denn durch die posttranslationalen Modifikationen kommt es zur Rekrutierung von stabilisierenden MAPs, die die Mikrotubuli vor dem Zerfall schützen, wodurch der mechanische Widerstand der MTs erhöht wird. Die meisten modifizierten Mikrotubuli befinden sich dabei vor allem in den Zellausläufern (Gundersen & Bulinski, 1988; Bulinski & Gundersen, 1991). Sowohl detyrosinierte als auch acetylierte Mikrotubuli akkumulieren zwischen dem Zentrosom und dem vorderen Ende der migrierenden Zelle (Gundersen & Bulinski, 1988; Montagnac et al., 2013; Castro-Castro et al., 2012). Des Weiteren vermitteln PTMs die Wechselwirkung der Mikrotubuli mit anderen Zytoskelett-Elementen bei der Migration. Dabei interagieren vor allem Mikrotubuli, die reich an detyrosinierten  $\alpha$ -Tubulin-Untereinheiten sind, mit Intermediärfilamenten (Liao & Gundersen, 1998; Kreitzer et al., 1999), die ein dichtes und widerstandsfähiges

Netzwerk bilden und an dem Erhalt der Zellform beitragen (Herrmann & Aebi, 2000; Burute & Kapitein, 2019). Zusätzlich zu den schiebenden Kräften der Mikrotubuli benötigt die Bildung von Zellausläufern den zielgerichteten Transport von Membrankomponenten und Proteinen. Aus diesem Grund ist die Anwesenheit von Mikrotubuli in der Nähe der Zellfront essentiell. So können Membranvesikel, post-Golgi Vesikel sowie Recyclingendosomen MT-abhängig zur Zellmembran befördert werden (Miller et al., 2009; Yadav et al., 2009). Aber auch wichtige Signalmoleküle werden auf diese Weise zur Zellfront transportiert (Osmani et al., 2010; Palamidessi et al., 2008).

Mikrotubuli sind ebenfalls wichtig für die Fokaladhäsionsdynamik bei der Zellmigration, indem sie die Bildung, die Reifung und den Abbau der fokalen Adhäsionen kontrollieren (zur Übersicht siehe: Etienne-Manneville, 2013). Mikrotubuli sind dabei physisch mit den Adhäsionskomplexen verbunden (Rinnerthaler et al., 1988). Dadurch sind sie in der Lage die Bildung neuer fokaler Adhäsionen zu fördern. MTs dienen unter anderem für den notwendigen direkten Transport von Integrinen zur Plasmamembran an der Zellfront (Bretscher & Aguado-Velasco, 1998). Während der Migration werden einige Mikrotubuli an den Adhäsionskomplexen an der Zellfront stabilisiert (Kaverina et al., 1998), wodurch der Transport von Integrinen ermöglicht wird. Dies wiederum fördert das Wachstum der unreifen Komplexe (Bretscher & Aguado-Velasco, 1998; Gu et al., 2011). Neben der Mehrzahl an Mikrotubuli, die in wandernden Zellen in Richtung Zellfront gerichtet sind, weist nur eine kleine Anzahl an Mikrotubuli in Richtung des Zellendes. Diese tragen unter anderem zum Abbau der fokalen Adhäsionen bei. Dies ist für das Ablösen der Zelle vom Substrat und das Nachziehen des Zellendes entscheidend (Bretscher & Aguado-Velasco, 1998; Kaverina et al., 1998, 1999; Rid et al., 2005). Es wurde beschrieben, dass dynamische Mikrotubuli mehrmals zu reifen Zell-Matrix-Kontakten hin wachsen, die sich daraufhin am Zellende auflösen (Kaverina et al., 1998; Krylyshkina et al., 2003). Dieses Ereignis wird vor allem in Bereichen beobachtet, in denen sich die fokalen Adhäsionen auflösen (Rid et al., 2005).

Außerdem beeinflussen Mikrotubuli die Dynamik der fokalen Adhäsionen, indem sie die Endozytose, die für die Auflösung der Adhäsionen entscheidend ist (Ezratty et al., 2009; Theisen et al., 2012), regulieren. Daneben dienen Mikrotubuli zum Cargo-Transport von intrazellulären Vesikeln. Dies ist möglich, da fokale Adhäsionen die kortikalen Mikrotubuli „festhalten“ und in ihrer Nähe stabilisieren (Stehbens et al., 2014).

## **1.6. Fragestellung dieser Arbeit**

Die Ausbildung der zellulären Polarität sowie die zugrunde liegenden Mechanismen dieses Prozesses sind für das Verständnis verschiedener Krankheiten und deren Entstehung von großer Bedeutung. Daher ist es wichtig den Mechanismus der

Ausbildung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität genau zu verstehen. Dabei spielen posttranslationale Tubulin-Modifikationen eine besondere Rolle. Daher sollte der Einfluss der Detyrosinierung auf die zelluläre Morphogenese untersucht werden, indem die TTL-Expression entweder durch einen stabilen *Knockout* der TTL oder durch die Überexpression eines TTL-GFP Fusionsproteins moduliert wird. Die Auswirkungen der unterschiedlichen TTL-Expression sollten in Hinblick auf die Ausbildung der Zellpolarität, die Architektur der Mikrotubuli sowie die Mikrotubuli-Dynamik biochemisch und fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden. Die posttranslationalen Tubulin-Modifikationen spielen darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Zellmigration. Die daraus resultierende Fragestellung, inwieweit posttranslationale Modifikationen einen Einfluss auf das Migrationsverhalten sowie auf die für die Migration essentiellen zelluläre Adhäsion in Epithelzellen haben, wurde ebenfalls in dieser Arbeit untersucht.

Canines Mx1 ist eine neue Komponente im intrazellulären Proteintransport. Dabei nimmt es eine regulatorische Funktion ein und beeinflusst den apikalen Transport von post-Golgi Vesikeln. Basierend auf diesen Beobachtungen stellte sich die Frage, wie Mx1 diese Transportvorgänge bewerkstelligt, denn der genaue Wirkmechanismus ist nicht verstanden. Dieser sollte im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit aufgeklärt und beschrieben werden. Hierzu wurde zunächst die Lokalisation von Mx1 innerhalb der Zelle fluoreszenzmikroskopisch sowie biochemisch untersucht, um Mx1-positive post-Golgi Vesikel genauer zu charakterisieren und um die Wirkweise von Mx1 zu verstehen. Zusätzlich wurde das dynamische Verhalten der großen GTPase sowie dessen Assoziation mit zellulären Membranen mit Hilfe der *Fluorescence Recovery after Photobleaching* (FRAP)-Methode beobachtet und gemessen. Die Frage nach der Assoziation von Mx1 mit dem Mikrotubuli-Zytoskelett und die Suche nach möglichen Interaktionspartnern war ebenfalls Bestandteil dieser Arbeit. Der Grund für die Interaktion mit  $\alpha$ -Tubulin war lange unklar, deswegen sollte die Mx1-Dynamik in Abhängigkeit von intakten Mikrotubuli untersucht werden. Daneben sollten Interaktionspartnern von Mx1, die eine Rolle im intrazellulären Vesikeltransport spielen, biochemisch identifiziert werden. Dadurch können Rückschlüsse auf den möglichen funktionellen Mechanismus von Mx1 gezogen werden. Diese Untersuchungen sollte durch verschiedene mikroskopische Analysemethoden unterstützt werden. So wurde im Verlauf dieser Arbeit das Motorprotein Kif5B als möglicher Interaktionspartner von Mx1 auf post-Golgi Vesikeln identifiziert. Außerdem sollte in diesem Zusammenhang untersucht werden, ob Mx1 einen Einfluss auf die Bindung von Kif5B an apikale Transportvesikel hat. Ein weiteres Ziel war es aufzuklären, ob Mx1 eine mögliche Fissionskomponente im intrazellulären Transport darstellt und die Abschnürung von Vesikeln unterstützt.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Material und Software**

#### **Inkubatoren**

Zellkultur-Inkubator HeraCell 150i (CO<sub>2</sub>-begast), Thermo Fisher Scientific  
Zellkultur-Inkubator Galaxy B (CO<sub>2</sub>-begast), RS Biotech  
37°C Inkubator, Heraeus  
Schüttel-Inkubator für Bakterienkultur Infors, Infors AG  
Schüttelinkubator für Bakterienkultur innova 4300, New Brunswick Scientific  
37°C Inkubator für Bakterienkulturen, Memmert  
Dampfgarer Multi Gourmet, Braun

#### **Sterilbänke**

Sterilbank für die Zellkultur HeraSafe, Kendro  
Sterilbank für die Bakterienkultur FASTER BHA-48, Thermo Fisher Scientific

#### **Zentrifugen**

Combi Plus Ultrazentrifuge, Sorvall-Thermo Fisher Scientific  
Kühlzentrifuge Allegra X-22R und Avanti J-20 XP, Beckman-Coulter  
Kühlzentrifuge BioFuge fresco und fresco21, Heraeus; Thermo Fisher Scientific  
Kühlzentrifuge Sigma 3K-30, Sigma  
Optima LE-80K, Beckman-Coulter  
Optima MAX-XP und Optima TL Ultrazentrifuge, Beckman-Coulter  
Rotofix 32A, Hettich GmbH & Co. KG  
Tischzentrifuge BioFuge pico, Heraeus; Thermo Fisher Scientific)  
Tischzentrifuge Sprout, Heathrow Scientific

#### **Rotoren**

JA12, TLA55, und TLS55 Beckman-Coulter  
Sigma 277/K, Sigma

#### **Schüttler**

Kippschüttler Rocker25, Labnet International Inc.  
Schüttler KS10, Edmund Buhler  
Überkopfschüttler REAX2, Heidolph

#### **Heizgeräte**

Heizblock MB-102, Bioer  
Heizblock UBD, Grant  
Heizgerät Tempcontrol 37-2 digital für Leica DMI6000B Leica Microsystems  
Thermomixer comfort, Eppendorf  
Wasserbad für die Gewebeschnitte in der Histologie, GFL

### **Elektrophorese- und Western Blot-Zubehör**

Elektrophoresekammer Mighty Small II, Hoefer  
Elektrophoresekammer miniVE, Hoefer  
Netzgerät EPS 301 Amersham  
Netzgerät EPS 501 Amersham  
Semi-Dry Elektrobloetter, PEQlab Biotechnologie GmbH  
Transblot Semi-Dry Transfer Cell BioRad  
Platten, „Spacer“, Kämme, Gießvorrichtung, Hoefer

### **PCR-Geräte**

peqSTAR 96X HPL Gradient, Peqlab Biotechnologie GmbH

### **Waagen**

Analysewaage SBC 22, ScalTec Instrumentents  
Präzisionswaage SI-114 Denver Instruments

### **Mikroskope**

Inverses Epifluoreszenzmikroskop DMI6000 B mit AM TIRF MC Modul, Leica  
Microsystems  
Inverses Lichtmikroskop Axiovert 10 Carl Zeiss AG, Oberkochen  
Konfokales-Laser-Scanning-Mikroskop (KLSM) TCS SP2 montiert auf DM IRE2,  
Leica  
Microsystems  
Personal Automated Lab Assistant (PAULA)- Mikroskop,  $\beta$ -Version, Leica  
Microsystems

### **Weitere optische Geräte**

Chemostar Professional System von Intas  
Multiplattenlesegerät infinite M200, 200 Pro, Tecan  
Nanodrop 2000c, Thermo Fisher Scientific

### **Sonstige Geräte**

Absaugsystem Vacusafe, Integra Bioscience  
Countess™ Cell Counter, Invitrogen  
Heizrührer Yellow Line MSH basic, Ika Labortechnik  
Membran-Vakuumpumpe Typ N86 KN.18, KNF Neuberger  
Mikrotom Leica RM2125RT, Leica Wetzlar  
pH-Meter pH510, Eutech Instruments  
Reinstwassersystem Elix UV, Millipore  
Vortex Genie 2, Scientific Industries

### **Software**

Adobe Photoshop CS5 Adobe  
Clone Manager 7 Scientific & Educational Software

GraphPad Prism 5, GraphPad  
 Image J (Fiji) Wayne Rasband  
 Imaris 8.1.2., Bitplane  
 Lab Image 1D, Intas  
 Leica LAS X und Leica LAS AF Leica Microsystems  
 Office 2013 Microsoft  
 Volocity PerkinElmer

## 2.2. Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 2.1 Verwendete Chemikalien**

Chemikalie	Bezugsquelle
Acrylamidmix	Carl Roth
Agarose	Carl Roth
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth
Ampicillin	Carl Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck
Antibody Diluent	Dako
Antipain	Sigma-Aldrich
Aprotinin	Carl Roth
Bacto-Agar	Carl Roth
Bacto-Trypton	Carl Roth
Bacto-Hefeextrakt	Carl Roth
Bromphenolblau	Carl Roth
Calciumchlorid	New England Biolabs
Chloroquin	Serva
Cycloheximid	Sigma-Aldrich
Dc-Protein Assay Kit	Biorad
DEAE-Dextran	Amersham
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Merck
Ethanol	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth
Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories
Geneticin (G418)	PAA Laboratories
Glycerin	Carl Roth
Glycerol	Merck
Glycin	Carl Roth
HEPES	Serva
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich
Kanamycin	Sigma-Aldrich
IgG Anti-Maus	Santa Cruz
Isopropanol	Carl Roth
Latrunculin B	Adipogen
Leupeptin	Sigma-Aldrich
L-Glutamin (100x)	PAA Laboratories
Lipofectamine 2000	Invitrogen

Magermilchpulver	Carl Roth
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich
Molekulargewichtsstandard für Agarosegele	New England Biolabs
Quick-Load 100 bp und 1 kb DNA-ladder	
Molekulargewichtsstandard für SDS-PA-Gele PageRuler	Fermentas
Mowiol 4-88	Carl Roth
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
N-Ethylmaleimide	Sigma-Aldrich
Nocodazol	Sigma-Aldrich
Nonidet P-40	Merck
Nycodenz	Axis Shield
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories
Pepstatin	Sigma-Aldrich
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific
PIPES	Carl Roth
Ponceau S	Carl Roth
Polyysin	Sigma-Aldrich
RNAiMax	Invitrogen
SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher Scientific
SYBR Safe	Invitrogen
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth
Tris	Carl Roth
Tris-Hcl	Carl Roth
Triton-X-100	Sigma-Aldrich
Trypsin/Chymotrypsin-Inhibitor	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories
Ziegenserum	Dako

Weitere, hier nicht aufgeführte, allgemein gebräuchliche Chemikalien wurden von Fluka, ICN, Merck, New England Biolabs, Roth, Riedel-de Häen, Serva oder Sigma bezogen und waren mindestens von p.a.-Qualität.

### 2.3. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
Amicon Zentrifugenfilter, 10 K Zentrifugenfilter	Merck
Deckgläser (42 mm x 0.17mm)	H. Saur
Deckgläser 18 mm	Menzel Gläser
Sterilfilter (Porengröße 0.45µm)	Sarstedt
Filterpapier Whatmann 3MM	Whatmann
Hamilton Mikroliterspritze (100µL)	Hamilton-Bonaduz AG
Kryoröhrchen	Sarstedt
Kulturschalen (10 cm, 3 cm, 6- und 24-Lochplatten) und PET-Filter-einsätze	Sarstedt
Nitrocellulose-Membran Protran	GE Healthcare
Objektträger	Menzel Gläser

Pipettenspitzen (10µL, 200µL, 1000µL)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2,0ml, 5,0ml, 15ml, 50ml)	Sarstedt
Skalpells, Spritzen, Kanülen	Braun
WillCo-dish®-Glasboden-Petrischalen	WillCo Wells
Zellschaber	Sarstedt

## 2.4. Immunologische Reagenzien

**Tabelle 2.3 Verwendete Primärantikörper**

(IF=Immunfluoreszenz, IHC=Immunhistochemie, WB=Westernblot).

Primärantikörper							
Antigen	Klon	Spezies	Hersteller	Verdünnung			
				WB	IF	PLA	IHC
α-Tubulin	DM1A	Maus	Sigma	1:4000	1:100	1:100	
β-Catenin		Kaninchen	Sigma			1:200	
β-Catenin	14/Beta-Catenin	Maus	BD Bioscience		1:200		
Alix	H-270	Kaninchen	Santa Cruz	1:200	1:200		
Alix	ab88388	Kaninchen	Abcam			1:200	
ERGIC-53	H-254	Kaninchen	Santa Cruz	1:100	1:50	1:50	
Gal3	H-160	Kaninchen	Santa Cruz	1:500			
Gal3	GTX113486	Kaninchen	GeneTex	1:5000			
GAPDH	6C5	Maus	Hytast	1:500			
Giantin		Kaninchen	Covance		1:400		
gp80	C-18	Ziege	Santa Cruz	1:2000			
GFP	full length	Kaninchen	Clontech	1:500			
GFP	JL-8	Maus		1:500			
hnRNP A2B1	DP2B3	Maus	Abcam			1:100	
Kif5A		Kaninchen	Abcam			1:100	
Kif5B		Ziege	Everest Biotech	1:200	1:200	1:200	
Mx1	2G12	Maus	OriGene	1:2000	1:100	1:100	
Mx1		Kaninchen	Protein Tech		1:200	1:100	
Paxillin	165/Paxillin	Maus	BD Bioscience	1:3000	1:100	1:100	
PDI	34	Maus	BD Bioscience	1:200			
Rab8	4/Rab4	Maus	BD Bioscience	1:500	1:100	1:50	
SC35	SC-35	Maus	Abcam		1:100	1:100	
SI	DRBB2/158	Maus	A. Quaroni				1:100
Tsg101	PR7130B	Kaninchen	Abcam	1:200			
Tubulin (acetyliert)	6-11B-1	Maus	Sigma	1:200			
Tubulin (detyrosiniert)		Kaninchen	Millipore	1:400	1:100	1:100	1:100
Tubulin (tyrosiniert)	YL1/2	Ratte	Santa Cruz	1:500	1:200	1:200	1:100
TTL		Kaninchen	Proteintech	1:500			1:100
Vinculin	hVIN-1	Maus	Sigma	1:300	1:200	1:400	

**Tabelle 2.4 Verwendete Sekundärantikörper**

(HRP, Horseradish Peroxidase, IF=Immunfluoreszenz, IHC=Immunhistochemie, WB=Westernblot).

Sekundärantikörper							
Antigen	Markierung	Spezies	Hersteller	Verdünnung			
				WB	IF	PLA	IHC
αMaus	HRP	Ziege	Bio-Rad	1:2000			
αKaninchen	HRP	Ziege	Bio-Rad	1:2000			
αZiege	HRP		Santa Cruz	1:2000			



$\alpha$ Ratte	HRP	Ziege	Bethyl	1:2000	
$\alpha$ Maus	Alexa488	Ziege	Invitrogen	1:200	
$\alpha$ Maus	Alexa488	Huhn	Invitrogen	1:200	
$\alpha$ Maus	Alexa546	Ziege	Invitrogen	1:200	
$\alpha$ Maus	Alexa647	Ziege	Invitrogen	1:200	
$\alpha$ Maus	Alexa647	Huhn	Invitrogen	1:200	1:400
$\alpha$ Kaninchen	Alexa488	Ziege	Invitrogen	1:200	
$\alpha$ Kaninchen	Alexa488	Huhn	Invitrogen	1:200	
$\alpha$ Kaninchen	Alexa546	Ziege	Invitrogen	1:200	
$\alpha$ Kaninchen	Alexa647	Ziege	Invitrogen	1:200	
$\alpha$ Kaninchen	Alexa555	Esel	Invitrogen	1:200	1:400
$\alpha$ Kaninchen	Alexa647	Huhn	Invitrogen	1:200	
$\alpha$ Ziege	Alexa647	Huhn	Invitrogen	1:200	
$\alpha$ Ratte	Alexa647	Huhn	Invitrogen	1:200	1:400
$\alpha$ Maus	Star580	Ziege	Aberrior	1:200	
$\alpha$ Kaninchen	StarRed	Ziege	Aberrior	1:200	
$\alpha$ Maus	MINUS	Esel	Olink Bioscience		1:5
$\alpha$ Kaninchen	PLUS	Esel	Olink Bioscience		1:5
$\alpha$ Ziege	PLUS	Esel	Olink Bioscience		1:5
$\alpha$ Kaninchen	MINUS	Esel	Olink Bioscience		1:5

## 2.5. Zellkultur

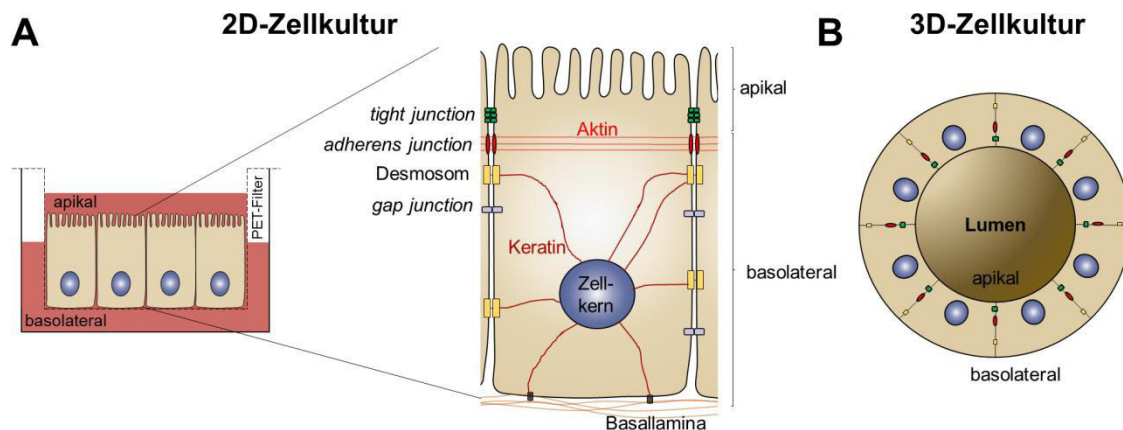
Mit Hilfe der Zellkultur ist es möglich, eukaryotische Zellen außerhalb des Organismus zu vermehren und zu kultivieren. Die in dieser Arbeit eingesetzten Zelllinien wachsen als Adhäsionskultur. Zum Subkultivieren der Zellen müssen diese enzymatisch, durch die Behandlung mit Trypsin-EDTA-Lösung, von der Unterlage abgelöst werden. Bei Trypsin handelt es sich um eine Protease, welche die hydrolytische Spaltung von Peptiden und Proteinen zwischen der Zelloberfläche und dem Untergrund katalysiert. EDTA ist ein Chelator und komplexiert zweiwertige Ionen, die die Proteinwechselwirkungen stabilisieren. Sind die Zellen abgerundet und voneinander getrennt, kann bei Bedarf die Zellzahl eingestellt werden und die Zellen in neuen Kulturgefäßen weiterkultiviert werden. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter einer sterilen *Laminar Air Flow*-Werkbank zum Schutz vor Kontaminationen. Jegliche Arbeitsutensilien wurden vorher autoklaviert, sterilisiert oder mit Ethanol desinfiziert.

### 2.5.1. Verwendete Zelllinien

#### MDCK Typ II Zellen

Madin Darby *canine kidney* (MDCK)-Zellen sind polare Epithelzellen und gelten als etabliertes Zellkulturmodell zur Untersuchung der Zellpolarisierung und des polaren Proteintransports (Rodriguez-Boulán et al., 2005; Dukes et al., 2011). Die Zellen wurden 1958 von S. H. Madin und N. B. Darby aus dem Nierenepithel eines gesunden, weiblichen Cocker Spaniels (*Canis lupus familiaris*) entnommen. Zunächst wurden sie für Studien zur viralen Infektion eingesetzt (Green, 1962), aber ihre Eigenschaften wurden erst 1966 von Gaush und Kollegen charakterisiert. Im Laufe der Zeit wurden ihre

strukturellen und funktionellen Eigenschaften in Kultur erkannt und sie gelten als Modellsystem für transportierende Epithelien. Bei MDCK-Zellen handelt es sich um eine kontinuierliche Epithelzelllinie, die *in vitro* ihre charakteristischen Epitheleigenschaften und eine ausgeprägte Zellpolarität beibehält. MDCK-Zellen sind polar ausgerichtet, dabei ist die apikale Membran zum Kulturmedium orientiert. Mit der basolateralen Domäne haften die Zellen an der Kulturunterlage. Eine weitere Eigenschaft dieser Zellen ist ihr Wachstum auf semipermeablen Membranen als konfluentes, einschichtiges Epithel mit einer geschlossenen Diffusionsbarriere (Abb. 2.1. A) (Cereijido et al., 1978; Misfeldt et al., 1976).



**Abb. 2.1. Kultivierung von MDCK Typ II Zellen in 2D- und 3D-Zellkultur**

(A) In der 2D-Zellkultur bilden MDCK-Zellen einen dichten und polaren Zellrasen mit einer apikalen und einer basolateralen Zelloberfläche. Durch die Kultivierung in Filtereinsätzen wird der Polarisierungsvorgang erleichtert und die Zellen entwickeln eine ausgeprägte Polarität. Außerdem ist die separate Untersuchung beider Membrandomänen möglich. (B) In der 3D-Zellkultur bilden MDCK-Zellen kugelförmige Zysten. Diese weisen ebenfalls eine apikale und basolaterale Zellpolarität auf (modifiziert nach Rodriguez-Boulán et al., 2005).

Abhängig von den Bedingungen ändert sich das Wachstumsverhalten. Durch die Kultivierung in geeigneten Kulturschalen können MDCK-Zellen bei der klassischen zweidimensionalen (2D)-Zellkultur als konfluente Monoschicht wachsen (Abb. 2.1. A) oder als Zysten in einer dreidimensionalen (3D)-Matrix (Abb. 2.1. B). Aus der parentalen MDCK-Zelllinie wurden zwei Subtypen, die sogenannten MDCK Typ I und Typ II Zellen, isoliert (Barker & Simmons, 1981; Richardson et al., 1981; Valentich, 1981). Der MDCK Typ II ist die am häufigsten eingesetzte MDCK-Zelllinie und diese wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet. Die verwendeten Zelllinien und ihre Kulturmedien sind in Tabelle 2.5 aufgelistet.

### COS-7 Zellen

COS-7 Zellen entstammen der CV-1 Zelllinie, die aus dem Nierengewebe der Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) isoliert wurde. Es sind Fibroblasten-ähnliche Zellen, die durch Transformation mit einer replikationsdefizienten Mutante des Simian Virus

(SV)-40 immortalisiert wurde (Gluzman, 1981). Da diese Zellen das große SV 40 T Antigen exprimieren, werden Plasmide, die eine SV-40 Replikationsstelle besitzen, in hoher Zahl kopiert. Durch die daraus entstehende starke Expression und wegen der flachen Morphologie der COS-7 Zellen, eignen sie sich besonders für verschiedene fluoreszenzmikroskopische Anwendungen.

### **2.5.2. Medien, Lösungen und verwendete Zelllinien**

Medien, Lösungen und Puffer wurden generell bei 4°C gelagert, um ihre Haltbarkeit zu sichern. Diese wurden erst unmittelbar vor Verwendung erwärmt. Vor Gebrauch wurden alle Zusätze unter sterilen Bedingungen hinzugegeben.

#### Kulturmedium für MDCK II Wildtyp, MDCK<sub>ΔTTL</sub> und MDCK<sub>ΔMx1</sub> Zellen

MEM mit 5% (v/v) FKS, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (100x), 1% (v/v) L-Glutamin (100x)

#### Kulturmedium für stabil transfizierte MDCK II Zellen

MEM mit 5% (v/v) FKS, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (100x), 1% (v/v) L-Glutamin (100x) mit zusätzlich 0,5 mg/mL G418

#### Selektionsmedium

MEM mit 5% (v/v) FKS, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (100x), 1% (v/v) L-Glutamin (100x) mit zusätzlich 1 mg/mL G418

#### Einfriermedium

DMEM (low glucose) oder MEM mit 20% (v/v) FKS, 10% (v/v) DMSO

#### Kulturmedium für COS-7 Zellen

DMEM (low glucose) mit 10% (v/v) FKS, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (100x) und 1% (v/v) L-Glutamin (100x)

#### Transfektionsmedium

Opti-MEM

#### PBS

140 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 6,5 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> gelöst in ddH<sub>2</sub>O (pH 7,35)

Alle verwendeten Zellkulturmedien sowie Opti-MEM wurden von der Marke Gibco von Thermo Scientific (Waltham, USA) bezogen.

Für die in dieser Dissertation durchgeführten Experimente wurden folgende Zelllinien verwendet oder generiert (\*):

Tabelle 2.5. Verwendete Zelllinien und ihre Eigenschaft(en)

Zelllinie	Eigenschaft(en)
MDCK II (Wildtyp)	Polare Epithelzellen aus der Hundeniere ( <i>Canis familiaris</i> )
MDCK <sub>ΔTTL</sub>	MDCK-II-Zelllinie mit einer Depletion der TTL Expression
MDCK <sub>TTL-GFP</sub>	MDCK-II-Zelllinie, die mit einem TTL-GFP exprimierenden Plasmid stabil transfiziert wurde
MDCK <sub>ΔMx1</sub>	MDCK-II-Zelllinie mit einer Depletion der Mx1 Expression
MDCK <sub>Mx1-GFP</sub>	MDCK-II-Zelllinie, die mit einem Mx1-GFP exprimierenden Plasmid stabil transfiziert wurde
MDCK <sub>ΔMx1+Mx1-GFP</sub> *	Mx1 depletierte MDCK-II-Zelllinie, die mit einem Mx1-GFP exprimierenden Plasmid stabil transfiziert wurde
MDCK <sub>ΔMx1+Mx1-GFP K549-552A</sub> *	Mx1 depletierte MDCK-II-Zelllinie, die mit einem Plasmid stabil transfiziert wurde, welches mutiertes, canines Mx1-GFP kodiert (Alanin-Scanning Mutante)
MDCK <sub>Mx1-GFP K549-552A</sub> *	MDCK-II-Zelllinie, die mit einem Plasmid stabil transfiziert wurde, welches mutiertes, canines Mx1-GFP kodiert (Alanin-Scanning Mutante)
MDCK <sub>p75-GFP</sub>	MDCK II-Zelllinie, die mit einem p75-GFP exprimierenden Plasmid stabil transfiziert wurde
MDCK <sub>ΔMx1+p75-GFP</sub> *	Mx1 depletierte MDCK II-Zelllinie, die mit einem p75-GFP exprimierenden Plasmid stabil transfiziert wurde
MDCK <sub>GFP</sub>	MDCK II-Zelllinie, die mit einem GFP exprimierenden Plasmid stabil transfiziert wurde
COS-7	SV-40 immortalisierte Fibroblasten-Zellen aus der Niere der Grünen Meerkatze ( <i>Cercopithecus aethiops</i> )

### 2.5.3. Subkultivierung und Passagieren der Zellen

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte standardmäßig in 10 cm Plastik Kulturschalen mit dem entsprechenden Medium (s. Kapitel 2.5.2) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Begasung und hoher Luftfeuchtigkeit in Brutschränken. Die Morphologie, Vitalität und das Wachstumsverhalten der Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop regelmäßig kontrolliert. Um den Fortbestand der einzelnen Zelllinien zu gewährleisten oder um die Zellen vor der Verwendung in einem Experiment in unterschiedliche Kulturgefäße, auf Deckgläschen oder Filtereinsätze auszusäen, wurden die Zellen in geringerer Konzentration in neue Kulturgefäße passagiert. Die Passage der Zellen zum Erhalt in Kultur erfolgte zweimal pro Woche. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit einer warmen Lösung aus 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA bei 37°C für 15 min inkubiert. Als sich die Zellen abgerundet und sich vollständig von der Kulturschale gelöst hatten, wurden sie in frischem Medium aufgenommen, um die Trypsinreaktion zu stoppen. Die Zellsuspension wurde bei 100 g für 5 min zentrifugiert, die überstehende Lösung abgesaugt und das Zellpellet in 10 mL des jeweiligen Mediums resuspendiert. Für die weitere Verwendung wurden die Zellen in einem bestimmten Verhältnis oder mit einer gewissen Zellzahl in das entsprechende Zellkulturgefäß

ausgesät. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Bis zum Versuchstag oder dem erneuten Passagieren lagerten die Zellen im Inkubator.

#### **2.5.4. Kryokonservierung und Auftauen von Kulturzellen**

Durch das Einfrieren von Zellen unter Verwendung von Gefrierschutzsubstanzen können diese bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff nahezu zeitlich unbegrenzt gelagert werden. Für die längerfristige Lagerung wurde eine konfluente 10 cm Kulturschale zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA abgelöst. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen wurde das Pellet in 1 mL Einfriermedium (s. Kapitel 2.5.2) resuspendiert und die Zellsuspension in ein Kryokonservierungsgefäß überführt. Das im Einfriermedium enthaltene Dimethylsulfoxid (DMSO) verhindert die Kristallbildung im Zellinneren. Die hohe Konzentration an FKS bietet den Zellen aufgrund des hohen Proteingehalts eine Schutzfunktion beim Einfrieren. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Gefrierbehälters, der eine langsame und gleichmäßige Temperatursenkung gewährleistet, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Nach 24 h wurden die Zellen in den Stickstofftank überführt.

Um Zellen wieder zu kultivieren, wurde dem Stickstofftank ein Kryokonservierungsgefäß mit den entsprechenden Zellen entnommen. Diese wurden zeitnah aufgetaut und um die zelltoxische Wirkung von DMSO bei RT zu verhindern, wurde die Zellsuspension in 9 mL Nährmedium verdünnt. Nach dem Zentrifugieren (100 g, 5 min) wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt, die Zellen in 10 mL frischem Medium aufgenommen und auf eine 10 cm Kulturschale überführt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

#### **2.5.5. Bestimmung der Zellzahl**

Um ähnliche Wachstumsbedingungen zu schaffen oder für die Vergleichbarkeit von Experimenten, wurde eine definierte Anzahl an lebenden Zellen ausgesät. Dazu wurde die Zellzahl der abgelösten Zellen mit Hilfe des Countess<sup>TM</sup> Cell Counter (Invitrogen) bestimmt. Zur Überprüfung der Vitalität der Zellen wurde die Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau gemischt. Es handelt sich dabei um einen anionischen Azofarbstoff, der nicht membrangängig ist und nur durch die geschädigte Membran toter Zellen in das Zytoplasma gelangt und dort an intrazelluläre Proteine bindet. Dadurch werden tote Zellen blau gefärbt. Mit dieser Vitalfärbung können lebende Zellen von toten Zellen unterschieden werden. Für die Anlegung von Zellkulturschalen mit derselben Ausgangszellzahl wurde die gewünschte Menge an Zellen unter Berücksichtigung der Lebendzellzahl ausgesät.

### 2.5.6. Transfektion

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von freier Nukleinsäure (DNA oder RNA) in eukaryotische Zellen (Old & Primose, 1980). Man unterscheidet dabei zwischen dem vorübergehenden Einbringen des genetischen Materials (transiente Transfektion) und dem dauerhaften Einbau der DNA in das Genom der Zellen (stabile Transfektion). Durch diese Art der genetischen Manipulation ist es möglich, die Genexpression zu modulieren, indem Proteine überexprimiert, herunterreguliert oder komplett depletiert werden. Außerdem können so Proteine fusioniert mit einem Reportergen exprimiert werden.

Mittlerweile steht eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Verfügung, um Fremd-DNA oder -RNA in eine Empfängerzelle einzubringen. Die chemische Methode, die Lipofektion, beruht auf der Komplexbildung von positiv geladenen, stark verzweigten Polymeren mit der negativ geladenen Nukleinsäure. Die entstandenen DNA-Reagens-Komplexe werden von der Zelle durch Endozytoseprozesse aufgenommen, wodurch die DNA so in die Endosomen gelangt. Diskutiert wird auch der Mechanismus einer spontanen Verschmelzung der DNA-beladenen Liposomen mit der Plasmamembran. Bislang ist der Mechanismus, wie die DNA aus dem Endomembransystem in den Zellkern gelangt, noch unbekannt. Diese Translokation ist allerdings eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Expression des Transgens, da im Zellkern die Transkription der Plasmid-DNA in mRNA stattfindet. Für die stabile Transfektion müssen die Zellen einem Selektionsdruck (durch z.B.: Geneticin, G418) ausgesetzt werden. Zellen, die das auf dem Plasmid kodierte Resistenzgen exprimieren können, überleben. Zellen, welche die Fremd-DNA abbauen oder nicht aufgenommen haben, sterben wegen der fehlenden Resistenz.

**Tabelle 2.6 Verwendete Plasmide**

<b>Plasmid</b>	<b>Beschreibung</b>
Mx1-GFP	canines Mx1 in pEGFP-C2 Vektor
Mx1-GFP <sub>K549-552A</sub>	canines Mx1 in pEGFP-C2 Vektor mutiert an der Position 549-552
Tubulin-mCherry	humanes Tubulin in pEF-mCherry Vektor (pEF-mcherry-Tubulin)
Paxillin-mCherry	humanes Paxillin in pmCherry NBC1 Vektor (Addgene Plasmid #50526; RRID:Addgene_50526)
Vinculin-mCherry	humanes Vinculin in mCherry-N1 Vektor (Addgene Plasmid #55160; RRID:Addgene_55160)
p75-DsRed	humanes p75 <sup>NTR</sup> in pDsRed-N1 Monomer Vektor

#### 2.5.6.1. Transfektion von MDCK-Zellen mit Lipofectamine 2000

Für die Transfektion mit Lipofectamine 2000 wurden MDCK-Zellen auf Zellkulturschalen im Verhältnis 1:4 ausgesät. Die Transfektion erfolgte entweder 8 h nach Aussaat, unmittelbar nachdem sich die Zellen abgesetzt haben, oder am darauffolgenden Tag.

Der Transfektionsmix setzt sich aus drei unterschiedlichen Komponenten zusammen. Der Ansatz A enthielt 2 mL Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) und 9 mL Lipofectamine. In Ansatz B wurden ebenfalls 2 mL Opti-MEM mit 13 µg Plasmid-DNA (Tabelle 2.6) gemischt (Mengenangaben für 10 cm Kulturschalen). Je nach Kulturgefäß wurde das Transfektionsvolumen angepasst. Die Plasmid-DNA wurde vor dem ersten Gebrauch 7 min bei 60°C erhitzt, um eventuelle bakterielle Kontaminationen zu verhindern. Beide Ansätze wurden für 5 min bei RT getrennt voneinander inkubiert. Anschließend wurden Ansätze A und B vermischt und für 30 min bei RT inkubiert. Am Ende dieser Inkubationszeit wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen und das Transfektionsgemisch wurde vorsichtig auf die Zellen getropft. Nach einer sechsständigen Inkubation bzw. nach der Inkubation über Nacht wurde die Lösung von den Zellen abgenommen und durch normales Kulturmedium ersetzt. Nach 24 h erfolgte ein erneuter Mediumwechsel.

#### **2.5.6.2. Transfektion von COS-7 Zellen mit DEAE Dextran**

Bei COS-7 Zellen eignet sich besonders die Transfektion mit DEAE-Dextran. DEAE ist ein polykationisches Polymer, das als Erstes beschrieben und für die erfolgreiche Transfektion von eukaryotischen Zellen eingesetzt wurde (Pagano & Vaheri, 1965).

Am Vortag der Transfektion wurden die COS-7 Zellen 1:10 in 10 cm Kulturschalen mit Deckgläschen ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden 6 µg Plasmid-DNA (Tabelle 2.6) und 48 µL 50x DEAE-Dextran-Lösung mit 2400 µL vorgewärmten DMEM ohne jegliche Zusätze vermischt und 15 min bei RT inkubiert, um die Ausbildung von DNA-DEAE-Komplexen zu ermöglichen. Währenddessen wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde der Transfektionsansatz gleichmäßig auf die Zellen getropft und die Kulturschale wurde für 1h in den Brutschrank gestellt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Transfektionslösung abgesaugt und durch Medium, das aus 10 mL DMEM ohne Zusätze, 100 µL 100x Chloroquin und 10% FKS bestand, ersetzt. Es folgte eine weitere Inkubation für 4h bei 37°C. Anschließend wurde dieses Medium verworfen und durch normales Kulturmedium ersetzt. Am darauffolgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

#### **2.5.6.3. Generierung stabiler Zelllinien**

Um Experimente reproduzierbar und aussagekräftig zu machen, wurden stabile Zelllinien erstellt. Für die Generierung stabiler Zelllinien wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.5.6.1 beschrieben, transfiziert. Nach 48h sollte ein Selektionsdruck durch eine hohe Menge an Geneticin (G418) (1 mg/mL) geschaffen werden. Dazu wurden die Zellen trypsinisiert und in hohen Verhältnissen (1:30 bis 1:60) auf neue Kulturplatten mit Selektionsmedium

gesplittet. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Mediumwechsel, bis sichtbare Zellkolonien heranwuchsen. Nach einer Woche wurde das Selektionsmedium durch normales Kulturmedium (mit 0,5 mg/mL G418) getauscht und so der Selektionsdruck wieder reduziert. Zur Isolierung einzelner, positiver Klone wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden Trypsin/EDTA-getränkte, gelochte Whatman-Papiere auf die Zellkolonien gelegt und für 20 bis 30 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Whatman-Papiere mit den abgelösten Zellen in 24-Lochschalen mit frischem Medium überführt. In den darauffolgenden Tagen wurden alle Zellen in eine nächst größere Zellkulturschale passagiert, bis sie in eine 10 cm Kulturschale überführt werden konnten. Die isolierten Klone wurden durch Fluoreszenzmikroskopie und/oder durch das Western Blot-Verfahren auf die Expression und die Expressionsstärke des gewünschten Proteins kontrolliert. Für die Weiterkultivierung und für Experimente wurden nur Zellklone mit einer Transfektionsstärke von mindestens 80% ausgewählt, für weitere Analysen eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### 2.5.6.4. RNA-Interferenz (RNAi)

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist eine der am häufigsten verwendeten Methoden, um die Translation bestimmter Zielgene herunter zu regulieren, indem die Zellen mit einer chemisch synthetisierten siRNA (*small interfering RNA*) transfiziert werden. Die siRNA ist eine 21-23 nt lange, doppelsträngige RNA (dsRNA) mit einem 2 nt Überhang am 3'-Ende, der homolog zu Abschnitten auf der Ziel-messenger RNA (mRNA) sein muss. Zunächst wird die siRNA mittels einer lipidvermittelten Transfektion in die Zellen eingeschleust. Dort bildet sie zusammen mit Dicer und anderen zellulären Proteinen einen Multienzymkomplex, den sogenannten RISC-Komplex (*RNA induced silencing complex*). Durch Entwindung der dsRNA innerhalb des RISC-Komplexes wird dieser aktiviert. Der vorliegende siRNA-Einzelstrang (grün) ist zur Ziel-mRNA komplementär und er vermittelt die Erkennung der mRNA durch die komplementäre Paarung. Der *passenger*-Strang (blau) wird degradiert. Die mRNA wird auf Grund der Nucleaseaktivität des RISC-Komplexes geschnitten und anschließend degradiert. Es kann keine Proteinsynthese des entsprechenden Proteins mehr stattfinden und dadurch wird die Expression des Zielgens herunterreguliert. Aus diesem Grund spricht man bei dieser Methode auch von einem siRNA vermittelten *Knockdown* auf Translationsebene.

In dieser Arbeit wurde diese Methode eingesetzt, um den Einfluss von Kif5B auf die Elongation von Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>-positiven Vesikeln zu untersuchen. Für die Versuche mit RNA wurden RNase freie Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße sowie RNase-freies ddH<sub>2</sub>O benutzt, um die Degradierung der siRNA zu verhindern. Verwendet wurden die Zelllinien MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP</sub> und MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP K549-552A</sub>. Zunächst wurden die Zellen



trypsinisiert und 250 µL der Zellsuspension wurden in eine 6-Lochplatte mit Deckgläschen und 2 mL frischem Kulturmedium überführt. Am darauffolgenden Tag wurden 7,5 µL RNAiMAX, ein für RNAi optimiertes Lipofectamine, oder insgesamt 300 pmol (100 pmol pro siRNA) mit 600 µL Opti-MEM getrennt angesetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne spezifische siRNA, um den unspezifischen Einfluss des verwendeten Lipofectamines auszuschließen. Zur Komplexbildung wurden die Ansätze mit RNAiMAX und siRNA gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen. Schließlich wurden die vermischten Transfektionsansätze auf die Zellen getropft. Die Transfektion erfolgte über Nacht im Brutschrank. Am Morgen des nächsten Tages wurde das Medium durch normales Kulturmedium ersetzt. Am Nachmittag des gleichen Tages wurden die Zellen für die Experimente vorbereitet (Lebendzell-Mikroskopie, Immunfluoreszenzfärbung oder Proteinexpression). Die RNAi-Experimente wurden mit folgenden siRNA-Duplices gegen Kif5B durchgeführt (Astanina & Jacob, 2010):

5'-GAG CAA GUG UAU AAU GAC UUU-3' / 3'-UUC UCG UUC ACA UAU UAC UGA-5'  
 5'-AAG CUG AGU GGA AAA CUU UUU-3' / 3'-UUU UCG ACU CAC CUU UUG AAA-5'  
 5'-GGA GUA UGA AUU GCU UAG UUU-3' / 3'-UUC CUC AUA CUU AAC GAA UCA-5'

Als Kontroll-siRNA zum Nachweis des siRNA-Effekts wurde eine siRNA gegen die in MDCK-Zellen nicht exprimierte Luciferase verwendet:

5'-CGU ACG CGG AAU ACU UCG ATT-3' / 3'-UCG AAG UAU UCC GCG UAC GTT-5'

## 2.6. Zellbiologische Methoden

### 2.6.1. Transepitheliale Widerstands (TER)-Messung

Die Ausbildung und Aufrechterhaltung einer funktionellen Barriere ist für die Funktion von Epithelzellen entscheidend. Die Entstehung dieser Barriere kann elektrophysiologisch getestet werden. In dieser Arbeit wurden zur Überprüfung der Integrität der Epithelschicht und der entwickelten Dichtigkeit der Zellschicht transepithelialer Widerstand (*transepithelial resistance*, TER)-Wert Messungen durchgeführt. Einen besonderen Einfluss auf die Dichtigkeit und den elektrischen Widerstand haben die für Epithelien typischen tight junctions. Mit Hilfe dieser Zell-Zell-Kontakte wird der Interzellularraum ab, wodurch eine Diffusionsbarriere gebildet wird, welche die Epithelpermeabilität beeinflusst. Der TER eignet sich als Indikator für die Integrität einer Monoschicht an Epithelzellen und für die Durchlässigkeit der Zellbarriere für Ionen.

Für die TER-Messung wurden MDCK-Zellen mit einer Dichte von je 309.420 Zellen in Filtereinsätzen ausgesät und kultiviert. Die Messung erfolgte in einem Triplett-Ansatz

über eine Zeitspanne von sechs Tagen mit Hilfe des Millicell ERS-2 Voltohmmeters (Millipore). Der ohmsche Widerstand der Zellschicht wird von der Dichtigkeit der *Tight Junctions*, die den intrazellulären Zwischenraum verschließen, bestimmt. Je dichter der Filter bewachsen ist, desto höher ist der elektrische Widerstand. Vor der Messung wurden die Elektroden für 15 min in 70%-igem Ethanol sterilisiert, anschließend kurz an der Luft getrocknet und in Kulturmedium äquilibriert. Währenddessen wurde das Medium der Zellen getauscht. Danach wurden die beiden Elektroden so platziert, dass sich eine Elektrode senkrecht im apikalen und die zweite senkrecht im basolateralen Filterkompartiment befanden. Die Spitzen der Elektroden tauchten in das Medium ein, berührten den Boden des Filters oder der Kulturschale aber nicht. Da die Messwerte abhängig von der Positionierung der Elektroden sind, wurde darauf geachtet, dass die Elektroden fest an einem Stativ montiert waren. Damit konnte eine einheitliche Positionierung gewährleistet und ein homogenes elektrisches Feld von Messung zu Messung erzeugt werden. Parallel wurde ein leerer Filtereinsatz mitkultiviert und vermessen. Die Messwerte wurden um den Wert dieses leeren Filters korrigiert. Der TER-Wert wurde nach folgender Formel ausgerechnet:

$$TER (Ohm * cm^2) = R * A$$

Dabei entspricht R dem gemessenen Widerstand (Ohm) über die Monoschicht und A der Größe der Wachstumsoberfläche (cm<sup>2</sup>).

### 2.6.2. Behandlung von Zellen

Um den Einfluss von Mikrotubuli auf die Dynamik Mx1-GFP-positiver Vesikel oder auf die Morphologie von Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>-haltigen Strukturen zu untersuchen, wurden MDCK<sub>Mx1-GFP</sub><sup>-</sup> bzw. MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP K549-552A</sub>-Zellen mit Nocodazol behandelt. Dieses zellpermeable Benzimidazol bewirkt die Depolymerisierung der Mikrotubuli, indem es die GTPase-Aktivität des Tubulins fördert. Dies führt zur Depolymerisierung und die Konzentration an GDP-gebundenen Monomeren erhöht sich (Mejillano et al., 1996). Je nach Versuch wurden die Zellen im Verhältnis 1:4 oder 1:10 gesplittet und im Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, wenn diese fixiert und gefärbt oder für die Lebendzell-Mikroskopie verwendet wurden. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung mit Nocodazol. Dazu wurden die unpolaren Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die Nocodazol-Stammlösung (Konzentration: 16,6 mM; Lagerung: bei -20°C, gelöst in: DMSO) wurde auf eine Konzentration von 33 μM verdünnt. Im Anschluss wurde zu den Zellen das Nocodazol-haltige Kulturmedium gegeben. Um einen Einfluss von DMSO ausschließen zu können, wurden die Zellen in einem Kontrollversuch mit der entsprechenden Menge an DMSO behandelt. Die Zellen wurden

dann für 1 h (bzw. 30 min) abgedunkelt auf Eis und anschließend eine weitere Stunde (bzw. 30 min oder 5 h) bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### **2.6.3. Scratch-Assay**

Das Prinzip des *Scratch-* oder auch *Wound Healing*-Assays besteht in der mechanischen Verletzung eines konfluent gewachsenen Zellrasens und die anschließende Aufnahme der Wanderung der Zellen in das verletzte Areal (Rodriguez et al., 2005). Mit dieser Methode ist es möglich das Migrationsverhalten unterschiedlicher Zellen zu untersuchen. Drei Tage vor Versuchsdurchführung wurden die Zellen in Kulturschalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert. Mit einer 10 µL Pipettenspitze wurde dann mechanisch ein schmaler Riss in das konfluente Epithel gezogen. Anschließend wurden die Zellen zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen, um die abgelösten Zellen zu entfernen.

Im Anschluss wurde vorgewärmtes Kulturmedium zugegeben. Mit Hilfe des Zell-*Imagers* PAULA (Leica Microsystems) wurden die Zellen über einen Zeitraum von 12h im Brutschrank unter optimalen Bedingungen beobachtet. Alle 15 min wurde eine Bild der Zellen aufgenommen, wodurch die Reinvansion durch das Einwandern der Zelle in die freie Fläche beobachtet und quantifiziert werden konnte. Die integrierte Software erlaubte eine Geschwindigkeitsmessung der Migration. Für die Immunfluoreszenz, wurden die Zellen drei Tage vor Versuchsbeginn auf Deckgläschen ausgesät. Die Durchführung erfolgte analog. Direkt und nach 3 h, 6 h, 9 h und 12 h nach Zufügen des Risses, wurden die Zellen für die Färbung fixiert.

## **2.7. Molekularbiologische Methoden**

### **2.7.1. Ortspezifische Mutagenese**

Der Begriff ortsspezifische Mutagenese (*site-directed mutagenesis*) beschreibt ein Verfahren, bei dem gezielt eine Mutation an einer bestimmten Stelle in einem Gen eingeführt werden kann, um so die DNA gezielt zu verändern. Dabei kann es sich um Insertionen, Deletionen oder um eine Basenaustauschmutation handeln. In dieser Arbeit wurde die Substitution der vier Lysine der L4-Schleife von Mx1 gegen Alanine durchgeführt. Durch den Austausch mit Alanin, der einfachsten chiralen Aminosäure, kann herausgefunden werden, ob die ausgetauschten Aminosäuren an Interaktionen beteiligt sind oder ob und für welche Funktion des Proteins sie wichtig sind. Ausgehend von einem zirkulären Template wird ein PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)-Produkt, das die ausgetauschten Basen enthält, amplifiziert und anschließend in kompetente Bakterien transformiert. Dort wird es zu einem Plasmid ligiert. Der Basenaustausch wird durch die erstellten Primer erzeugt, welche die gewünschte Mutation enthalten.

Außerdem enthalten die Primer eine Enzymschnittstelle zum Nachweis der erfolgreichen Einführung der Mutation in die DNA. Um das Ausgangs-Plasmid aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, erfolgt ein Verdau mit dem Enzym DpnI. Diese Endonuclease erkennt und spaltet die methylierte Ausgangs-DNA. Das nicht-methylierte PCR-Produkt wird nicht abgebaut und kann so selektioniert und für die Transformation verwendet werden. Es wurden folgende Primer benutzt (mutierte Nukleotide sind durch kleine Buchstaben markiert):

5'-GAT TCG GAC GAG GAG ggc gcc gct gct ACC AGC AGC ATG AGC-3'

5'-GCT CAT GCT TCG GGT agc agc ggc cgc CTC CTC GTC CGA ATC-3'

Die durchgeführte Mutagenese ging von dem bereits vorhandenem Plasmid Mx1-pEGFP-C2, welches das Mx1-Gen enthält, aus. Das eingesetzte Mutageneseprimerpaar wurde so erstellt, dass sie 15 nt-lange zum Gen komplementäre Sequenzen vor und hinter dem zu mutierenden Bereich besaßen. Damit waren die Primer in der Lage mit der Zielsequenz zu hybridisieren. In der Mitte befand sich die zu mutierende 12 nt-lange Sequenz und eine EagI (Eco521)-Schnittstelle. Der GC (Guanin, Cytosin)-Gehalt der Primer betrug 66,7%. Außerdem befand sich mindestens ein Guanin oder Cytosin am Anfang oder Ende der Primersequenz. Um die Effizienz der Mutagenese-PCR zu erhöhen, wurde das Ausgangsplasmid zunächst denaturiert. Dazu wurden zu 10 µg Plasmid-DNA 40 µL ddH<sub>2</sub>O sowie 10 µL 1M NaOH/1mM EDTA gegeben und für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch mit 5 µL 3M NaAc (pH 4,8) neutralisiert und die DNA mit 150 µL eiskaltem 100%-igem Ethanol präzipitiert. Die denaturierte DNA wurde durch Zentrifugation (17.000 g, 10 min, 4°C) gesammelt. Der Überstand wurde abgenommen und das DNA-Pellet mit 150 µL 70%-igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet. Zuletzt wurde die DNA in 20 µL ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Für die anschließende PCR-Reaktion wurde denaturierte Matrizen-DNA in einer Konzentration von 50 ng in einem Reaktionsvolumen von insgesamt 50 µL eingesetzt. Folgendes Pipettierschema wurde für die Präparation des PCR-Reaktionsansatzes verwendet:

Volumen	Reagenz
10 µL	Reaktionspuffer (5x HF Phusion Buffer)
1 µL	10 mM dNTP-Mix (2.5 mM pro NTP)
2,5 µL	<i>forward</i> -Primer (10 µM)
2,5 µL	<i>reverse</i> -Primer (10 µM)
x µL (50 ng)	denaturierte Plasmid-DNA
0,5 µL	Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase
Auffüllen auf 50 µL mit ddH <sub>2</sub> O	

Der Reaktionsansatz wurde gut gemischt und anschließend im PCR-Gerät inkubiert. Das PCR-Gerät wurde dabei auf folgenden Ablauf programmiert:

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	95	1 min	1
Amplifikation			
Denaturierung	95	30 sec	16
Annealing	55	1 min	
Polymerisation	68	12 min	
Finale Elongation			
Denaturierung	94	1 min	1
Annealing	55	1 min	
Polymerisation	72	10 min	

Anschließend wurde das Ausgangsplasmid über den Verdau mit DpnI aus dem Ansatz entfernt. Dazu wurden 40 µL PCR-Produkt mit 5 µL 10x *FastDigest Green Buffer* (Thermo Fisher Scientific), 1 µL DpnI (10 U/L) und 4 µL ddH<sub>2</sub>O vorsichtig durchmischt und anschließend für 2h bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden chemisch-kompetente *E. coli* DH5α-Zellen mit 20 µL des Ansatzes transformiert (s. Kapitel 2.7.2).

### 2.7.2. Transformation chemisch-kompetenter *Escherichia coli*-Bakterien

Der Begriff Transformation beschreibt die direkte Aufnahme freier DNA aus der umgebenden Umwelt in eine Bakterienzelle ohne einen speziellen Überträger. *E. coli*-Bakterien müssen für die Aufnahme von genetischem Material zuerst kompetent gemacht werden. Dazu werden die Zellen chemisch behandelt, um ihnen diese künstliche Kompetenz zu verleihen. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode handelt es sich um die Calciumchlorid-Behandlung mit anschließendem Hitzeschock.

Für die Transformation wurden chemisch kompetente *E. coli* DH5α-Zellen verwendet. Dazu wurden 100 µL Bakteriensuspension langsam auf Eis aufgetaut und anschließend mit dem zu transformierenden DNA-Ansatz vermischt. Wiederum wurden die Zellen auf Eis für 30 min inkubiert. Dabei lagerte sich die DNA an die Plasmamembran der Zellen an. Durch einen Hitzeschock bei 42°C für 45s kann die DNA in die Zelle gelangen. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurde 1 mL SOC- oder LB-Medium ohne Selektionsantibiotika zu den Bakterien gegeben und für 1h bei 37°C leicht geschüttelt. In dieser Zeit regenerierten sich die Zellen und exprimieren das auf dem Vektor kodierte Resistenzgen. Die Bakterien wurden für 1 min bei 2400 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 50 µL abgenommen und das Bakterienpellet im Restüberstand resuspendiert. Nachfolgend wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

**LB-Medium**

1% (w/v) Bacto Trypton  
1% (w/v) NaCl  
0,5% (w/v) Hefe-Extrakt

**LB-Agar**

LB-Medium mit zusätzlich

1,5% (w/v) Agar-Agar

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen wurde das Antibiotikum zugegeben.

(Ampicillin: 100 µg/mL Medium, Kanamycin: 25 µg/mL Medium)

**SOC-Medium (pH 7,0)**

2% (w/v) Bacto Trypton  
0,5% (w/v) Hefe-Extrakt  
10 mM NaCl  
2,5 mM KCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM MgSO<sub>4</sub>

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen wurde 20 mM Glucose (sterilfiltriert) zugegeben.

**2.7.3. Präparation von Plasmiden**

Bei Plasmiden handelt es sich um kleine, zirkuläre DNA-Moleküle, die autonom und unabhängig vom bakteriellen Genom repliziert werden. Sie kommen natürlicherweise in Bakterien vor und sind für die Vermittlung wichtiger Gene, wie Antibiotikaresistenzgene, verantwortlich. Plasmide werden in der Molekularbiologie für die Klonierung von DNA-Segmenten, für die Plasmid-Mutagenese oder für den Transfer von Genen in eine Zelle und die anschließende heterologe Expression von Fremdproteinen verwendet. Zur Vermehrung und der anschließenden Analyse der Plasmide werden *E. coli*-Bakterien verwendet. Zur Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNS wurde die Methode der Plasmid-Minipräparation angewandt. Anschließend folgte die analytische Untersuchung.

Dazu wurden zunächst positive Kolonien von der LB-Agarplatte mit einer sterilen Mikropipetten-Spitze in 3 mL LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37°C in einem Schüttelinkubator wachsen gelassen. Die Plasmidpräparation wurde mit dem Expres<sup>TM</sup> Plasmid SV mini Kit (Geneall) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wird das Prinzip der alkalischen Lyse verwendet (Birnboim & Doly, 1979). Die komplette Übernachtskultur wurde durch Zentrifugation bei 17.000 g für 1 min pelletiert und anschließend mit einem Resuspensionspuffer, welcher mit RNase supplementiert war, komplett resuspendiert. Durch Zugabe des Lysepuffers erfolgte die Zellyse im alkalischen Milieu. Das enthaltene SDS bewirkte das Auflösen der bakteriellen Zellmembran und die Freisetzung von Proteinen, des Bakterienchromosoms, anderer Zellbestandteile und der Plasmid-DNA. Außerdem enthielt der Puffer Natriumhydroxid (NaOH), das den pH-Wert ansteigen ließ. Folglich wurden DNA und Proteine denaturiert. Nach Zugabe des Neutralisierungspuffers kam es zur Fällung der chromosomalen DNA und der Proteine. Nach dem

Abzentrifugieren wurde der Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt, auf Glasmikrofasersäulchen gegeben. Die Glasoberfläche bindet die DNA, wodurch diese mit Ethanol-haltigen Puffern gewaschen werden konnte. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µL TE-Puffer eluiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für die Isolation größerer Mengen an Plasmid-DNA wurden 200 mL LB-Medium und entsprechendes Selektionsantibiotikum mit einer 5 mL Vorkultur angeimpft. Die Präparation der Plasmid-DNA aus dieser Bakterienkultur erfolgte mit Hilfe des Plasmid MaxiPrep Kits (Jetstar 2.0) nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA wurden photometrisch bestimmt.

#### 2.7.4. Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen (auch Restriktionsenzyme genannt) sind Enzyme bakteriellen Ursprungs, welche in der Lage sind, die DNA durch Spaltung innerer Phosphodiester-Bindungen abzubauen. Durch den Restriktionsverdau wurde überprüft, ob ein bestimmtes DNA-Stück in den Vektor integriert wurde, oder ob die Plasmid-DNA die gewünschte Mutation trägt.

Zur Überprüfung der erfolgreich eingeführten Mutation in das Mx1-pEGFP-C2 Plasmid wurden die Restriktionsenzyme EagI (Eco521) und AgeI eingesetzt. Bei erfolgreicher Mutation wurde der Vektor viermal geschnitten. Kam es zu keiner Basenaustauschmutation, wurde das verwendete Plasmid nur dreimal geschnitten werden. Der 20 µL Reaktionsansatz wurde nach folgendem Pipettierschema angesetzt:

Volumen	Reagenz
1 µg	DNA
2 µL	Reaktionspuffer (10x FastDigest® Green buffer)
1 µL	FastDigest EagI (Eco521) (Thermo Fisher Scientific)
1 µL	FastDigest AgeI (Thermo Fisher Scientific)
Auffüllen auf 20 µL mit ddH <sub>2</sub> O	

Das Reaktionsgemisch wurde für 15 min bei 37°C inkubiert und die Fragmente anschließend mit Hilfe eines 1%-igen Agarosegels aufgetrennt.

#### 2.7.5. Agarosegel-Elektrophorese

Die Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten erfolgt standardmäßig mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese. Die negativ-geladene DNA wandert durch Anlegen eines elektrischen Feldes der Größe nach zur Anode. Die Gel-Matrix dient als molekulares Sieb, da kleinere DNA-Fragmente schneller die Poren des Agarosegels passieren können als größere. Die Größe der Poren eines Agarosegels hängt von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente ab und wird durch die Agarosekonzentration bestimmt. In dieser Arbeit wurden 1%-ige (w/v) Agarosegele hergestellt und verwendet.

Dazu wurde Agarosepulver mit einer Endkonzentration von 1% in 1x TAE-Elektrophoresepuffer durch Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen wurde der Farbstoff SYBR® Safe DNA Gel Stain zugegeben. Dadurch konnte später die aufgetragene DNA durch UV-Licht sichtbar gemacht werden. Anschließend wurde das noch flüssige Gel in eine Horizontalgelkammer (Peqlab) mit passendem Gelkamm gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurde es in der Elektrophoresekammer (Peqlab) platziert und mit 1x TAE Puffer überschichtet. Auf jedes Gel wurden 10 µL eines DNA-Größenstandards aufgetragen. Die DNA-Proben wurden entweder vor dem Beladen des Gels mit 6x Ladepuffer gemischt oder direkt in die Geltaschen pipettiert, wenn sie bereits mit dem 10x FastDigest Green Buffer (Thermo Fisher Scientific) vermischt waren. An die Gelelektrophoresekammer wurde eine Gleichstromspannung von 100 V angelegt. Nachdem die DNA-Fragmente ausreichend aufgetrennt waren, wurden sie mit Hilfe des Intas Detektionssystems unter UV-Licht visualisiert. Anhand des DNA-Größenstandards konnte die Größe der Fragmente abgeschätzt werden.

**50x TAE-Elektrophoresepuffer** (1000 ml; pH 8,3)

242 g	Tris/HCl
57,1 ml	Essigsäure
100 ml	0,5 M EDTA pH 8,0

## 2.8. Proteinbiochemische Methoden

### 2.8.1. Herstellung von Zelllysaten

Zur Ermittlung der Proteinexpression oder für biochemische Studien wurden Zelllysate hergestellt. Die darauffolgende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und das Western Blot Verfahren ermöglichten die Analyse der Proteine. Dafür wurden die Zellen auf Kulturschalen ausgesät und bis zum Versuchstag wachsen gelassen. Um den Abbau der Proteine durch Proteasen zu vermeiden, wurden alle Arbeitsschritte auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden dann auf Eis gestellt. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS<sup>++</sup> gewaschen. Anschließend wurde, je nach Größe der Kulturschale, 100 µL bis 1 mL eiskalter Lysepuffer und ein Proteaseinhibitor (PI)-Mix zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden dann mit Hilfe eines Zellschabers von der Wachstumsfläche abgeschabt und die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Lyse erfolgte bei 4°C auf dem Überkopfschüttler für 30 min. Durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 17.000 g und 4°C konnten unlösliche Zellbestandteile und Zelltrümmer vom löslichen Zelllysate getrennt werden. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Proteinlysate wurde direkt für die Proteinbestimmung bzw. zur Auftrennung durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet oder bis auf weiteres bei -20°C eingefroren.



**Lysepuffer**

150 mM	Tris (pH 8)
150 mM	NaCl
150 mM	EDTA
1% (v/v)	Triton-X-100

**Proteaseinhibitoren**

Lösung 1:	PMSF (3,4 mg/ml in DMSO)
Lösung 2:	20 µL Pepstatin (1 mg/ml in DMSO)
	20 µL Antipain (1 mg/200 µl in DMSO)
	20 µL Leupeptin (1 mg/200 µl in PBS)
	20 µL Aprotinin (1 mg/ml in PBS)
	20 µL Trypsin/Chymotrypsin-Inhibitor (25 mg/500 µl in PBS)

**Gebrauchslösung:** 25 µL Lösung 1 + 500 µL Lösung 2

**2.8.2. Proteinbestimmung nach Lowry**

Bei der Proteinbestimmung nach Lowry handelt es sich um eine einfache, aber sensitive Methode, um die im Lysat enthaltene Proteinkonzentration quantitativ zu bestimmen (Lowry et al., 1951).

In dieser Arbeit wurde das *DC™ Protein Assay Kit* (Biorad) benutzt. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine 96-Lochplatte benutzt und alle Proben wurden im Triplikat aufgetragen. Verwendet wurden jeweils 5 µL Proteinlysate oder 5 µL der BSA-Verdünnungsreihe. Als Erstes wurde Lösung A mit Lösung S im Verhältnis 1:50 gemischt. Davon wurden 20 µL in die Mikrotiterplatte, in der sich bereits das Lysat bzw. die BSA-Verdünnungsreihe befand, pipettiert. Im Anschluss wurde 200 µL der Reagenz B hinzugegeben. Für die Messung der Lichtabsorption bei 750 nm wurde der Tecan infinite M2000 verwendet. Der Proteingehalt der Lysate wurde dann mit Hilfe einer Ausgleichsgeraden der BSA-Standardreihe berechnet.

**2.8.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS (*sodium dodecyl sulfate*)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ist eine Standardmethode zur Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts durch Anlegen einer elektrischen Spannung und durch denaturierende Bedingungen, bewirkt durch einen Überschuss an SDS. Vor dem Auftrennen der Proteine mit einem Polyacrylamidgel wurden die Proteingemische in Anwesenheit der Reduktionsmittel DTT (Dithiothreitol) und SDS, die im verwendeten SDS-Probenpuffer enthalten waren, bei 95°C aufgekocht. DTT sorgt beim Aufkochen für das Aufbrechen der im Protein enthaltenen Disulfidbrücken und es verhindert die Ausbildung von Disulfidkreuzvernetzungen. SDS ist ein anionisches Detergenz, das Proteine denaturiert, indem es an hydrophobe Bereiche der Proteine bindet und nichtkovalente Wechselwirkungen aufhebt. Die Eigenladung der Proteine wird durch die negative Ladung des SDS maskiert. Aus diesem Grund wandern die SDS-Protein-Komplexe auf

Grund ihrer einheitlichen negativen Ladung im elektrischen Feld zur Kathode und können so proportional ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden.

Zur Auftrennung wurde die diskontinuierliche Gelelektrophorese nach Lämmli verwendet, bei der zwei verschiedene Gele, ein Sammel- und ein Trenngel, mit unterschiedlichen Eigenschaften kombiniert werden (Laemmli, 1970). Das niederprozentige, weitmaschige Sammelgel, besitzt eine geringere Ionenkonzentration mit einem pH-Wert von 6,8. Durch das Sammelgel werden die Proteine fokussiert und anschließend im Trenngel, das eine höhere Ionenkonzentration und einen pH-Wert von 8,8 besitzt, nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Porengröße und damit die Trennungseigenschaften des Gels hängen von der eingesetzten Konzentration von (Bis)Acrylamid ab. Abhängig vom Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine wurde die (Bis)Acrylamidkonzentration angepasst. Vor der Beladung der SDS-PAGE wird das Trenngel hergestellt und mit dem Sammelgel überzogen. Acrylamid bildet bei der radikalischen Polymerisation lange Molekülketten, die durch die Kopolymerisierung mit N,N-Methylenbisacrylamid quervernetzt werden. In der Polymerisationsreaktion diente Ammoniumpersulfat (APS) als Starterreagenz und N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED) als Katalysator.

Bei der Vorbereitung wurden die Proben mit 3x SDS-Probenpuffer vermischt und für 7-10 min bei 95°C aufgeköcht und anschließend abzentrifugiert. Nachdem die Gele in die mit Laufpuffer gefüllte Apparatur gespannt wurden, erfolgte die Beladung der Gele mit den Proben. Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgt durch einen zusätzlich aufgetragenen Proteinmarker, der Standardproteine mit definiertem Molekulargewicht enthielt. Zum Fokussieren der Proteine im Sammelgel wurde eine Spannung von 80 V (bei kleinen Polyacrylamid-Gelen) und 110 V (bei großen Polyacrylamid-Gelen) für 25 min angelegt. Anschließend wurde die Spannung auf 160 V erhöht, bis die komplette Auftrennung der Proben erfolgte. Die Gele wurden anschließend für den Western Blot vorbereitet.

#### **3x-SDS-Probenpuffer**

6% (w/v)	SDS
30% (w/v)	Glycerin
150 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
0,02% (w/v)	Bromphenolblau
150 mM	DTT

#### **SDS-Laufpuffer**

25 mM	Tris
190 mM	Glycin
0,1% (w/v)	SDS

#### 2.8.4. Western Blot und Immunodetektion

Der Western Blot ist ein Verfahren, mit dem einzelne Proteine in einem komplexen Proteingemisch identifiziert und quantitativ bestimmt werden können, indem die zuvor in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können mit Hilfe eines elektrischen Feldes senkrecht zum Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen werden. Durch hydrophobe Wechselwirkungen werden die Proteine an der Membran immobilisiert. Die Proteine werden auf die Membran im selben Muster wie im Gel übertragen, sodass sich auf der Membran eine exakte Kopie des Gels befindet. Mit Hilfe spezifischer Antikörper können die Proteine immunologisch detektiert und nachgewiesen werden, da ihre immunologische Reaktivität erhalten bleibt. Aus diesem Grund wird diese Technik auch Immunoblotting genannt.

In dieser Arbeit kam das *semi-dry* Western Blot-Verfahren zum Einsatz (Burnette, 1981). Dazu wurden die Nitrozellulose-Membran sowie das SDS-Gel und Whatman-Filterpapiere in den Transferpuffer getränkt, um eine konstante Übertragung des elektrischen Stromes zu ermöglichen. Das im Puffer enthaltene Ethanol aktiviert die Membran. Anschließend folgte der Aufbau. Dabei befand sich die Membran zwischen zwei Whatman-Filterpapieren. Auf der Membran wurde das SDS-Gel positioniert. Durch das Glattstreichen des Gels wurden Luftblasen, die den Übertragungsprozess stören, entfernt. Der fertige Aufbau wurde im Elektroblothing-System so positioniert, dass die Membran zur Anode zeigte. Nachdem ein elektrisches Feld angelegt wurde, wanderten die negativ geladenen Proteine aus der SDS-Gelmatrix auf die Membran. Der Proteintransfer erfolgte bei 12 V, 400 mA für 55 bis 70 min je nach Größe und Acrylamidkonzentration des SDS-Gels.

Zur Überprüfung und visuellen Kontrolle des Transfers wurde die Membran in einer Färbelösung aus Ponceau S und Essigsäure geschwenkt. Ponceau S färbt Proteine, die auf die Nitrozellulose-Membran übertragen wurden, reversibel und unspezifisch an. Nach der Färbung wurde die Membran zum Entfärben kurz in ddH<sub>2</sub>O geschwenkt. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen der Erst- und Zweitantikörper auf der Membran durch Inkubation mit 5% (w/v) Magermilchpulver, gelöst in PBS, für 1 h blockiert. Nach dem Blockierungsschritt wurde die Membran zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit Antikörperlösungen gegen die auf der Membran gebundenen Zielproteine. Die spezifischen Primärantikörper (Tabelle 2.3) wurden mit der angegebenen Verdünnung in PBS mit oder ohne BSA verwendet. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Dabei fand die Antikörperbindung an das zu detektierende Protein statt. Danach wurde die Membran viermal mindestens 10 min in PBS gewaschen, um ungebundene und überschüssige Primärantikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran mit dem jeweiligen Meerrettichperoxidase

(*horse radish peroxidase*, HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper, der gegen den artspezifischen, konstanten Fc-Teil des Erstantikörpers gerichtet ist, in der angegebenen Verdünnung (Tabelle 2.4) für 1 h bei RT inkubiert. Nach wiederholtem Waschen, um ungebundene Sekundärantikörper zu entfernen, wurden die Proteine mit Hilfe der ECL (*enhanced chemiluminescence*)-Methode detektiert. Bei dieser sensitiven Methode katalysiert das HRP-Enzym, durch Zugabe von ECL-Lösung und  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Oxidationsmittel, die Oxidation von Luminol, wobei Chemilumineszenz freigesetzt wird. Nach gleichmäßiger Verteilung der ECL-Lösung auf dem Western Blot wurde das entstehende Chemilumineszenz-Signal mit Hilfe des Chemostar Professional Systems (Intas) detektiert und dokumentiert.

#### **Transfer-Blotpuffer**

48 mM	Tris/HCl
39 mM	Glycin
0,04% (w/v)	SDS
20% (w/v)	Ethanol

#### **Ponceau-Rot Färbelösung**

0,1% (w/v)	Ponceau S
1%	Essigsäure

### **2.8.5. Immunpräzipitation**

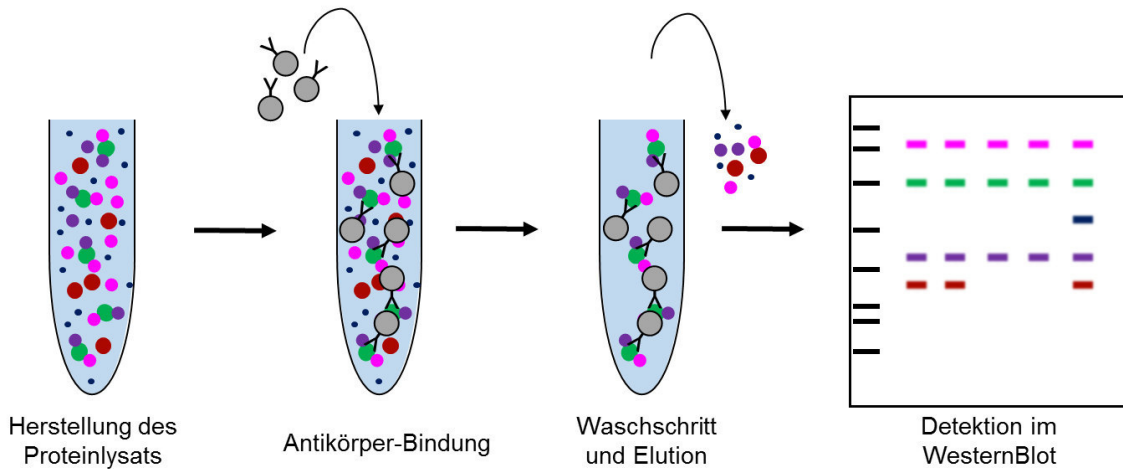
#### **2.8.5.1. (Co)-Immunpräzipitation**

Die Immunpräzipitation (IP) ermöglicht die Isolierung bestimmter Proteine aus einem Proteingemisch, um Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Durch Zusage eines spezifischen Antikörpers, der an eine stationäre Phase (*Agarose-beads* oder *Dynabeads*) gebunden ist, ist es möglich, ein bestimmtes Protein aus dem Zelllysat zu präzipitieren. Da Proteinkomplexe unter bestimmten Bedingungen intakt bleiben, können die Interaktionspartner des so isolierten Proteins co-präzipitiert werden (Abb. 2.2.).

#### **Co-Immunpräzipitation von Mx1-GFP**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mögliche Interaktionspartner von Mx1-GFP mittels Co-Immunpräzipitation (Co-IP) unter Verwendung von GFP-Trap\_A-*beads* (Chromotek) analysiert. Bei diesen Nano-Traps handelt es sich um *Agarose-beads*, die irreversibel mit einer  $\text{V}_\text{H}\text{H}$  (engl.: *variable domain of heavy chain antibodies*)-Domäne, einem sogenannten Einzeldomänenantikörper (*nanobody*), gekoppelt ist. Dabei handelt es sich um monomere Antikörper, die wegen ihrer Struktur auch Schwere-Kette-Antikörper (engl.: *heavy chain antibodies*, hcAbs) genannt werden. Sie besitzen ein Molekulargewicht von 13 kDa und sind damit die kleinsten intakten antigenbindenden Fragmente (Hamers-Casterman al., 1993). Außerdem besitzen sie eine hohe Affinität,

wodurch die Effizienz der Immunpräzipitation um ein Vielfaches besser ist als im Vergleich zu normalen Immunglobulinen.



**Abb. 2.2. Prinzip der Co-Immunpräzipitation**

Das Proteinlysate enthält das Zielprotein sowie damit interagierende Proteine. Die Zugabe von spezifischen Antikörpern oder *nanobodies*, die an *beads* immobilisiert sind, führt zu der Bindung des Zielproteins an die *beads*. Die Proteine, die mit dem Zielprotein interagieren, werden auf diese Weise indirekt an die *beads* gebunden. Nach dem Waschen wird das restliche Proteinlysate entfernt und nachfolgend werden die gebundenen Proteine von den *beads* eluiert. Im Anschluss werden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot detektiert.

Für die Untersuchung der Protein-Protein-Interaktionen wurden  $2,6 \times 10^6$  MDCK-Zellen (MDCK<sub>Mx1-GFP</sub>, MDCK<sub>ΔMx1+Mx1 GFP</sub> oder MDCK<sub>Mx1-GFP K549-552A</sub>) auf 10 cm Kulturschalen ausgesät und bis zum Erreichen der Polarität im Brutschrank kultiviert. Um den Abbau der Proteine und die Proteolyse zu verhindern, wurden alle Schritte der Immunpräzipitation auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst zweimal mit eiskaltem, sterilfiltriertem PBS<sup>++</sup> gewaschen. Nach Zugabe von 500 µL Lysepuffer wurden die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Herstellung der Zelllysate wurde, wie in Kapitel 2.8.1 Herstellung von Zelllysaten beschrieben, durchgeführt. Durch das im Lysepuffer enthaltene N-ethylmaleimide (NEM) werden freie Thiolgruppen alkyliert. Dies bewirkt die Stabilisierung schwacher und/oder transienter Interaktionen, indem die spezifische Konformation von Mx1 erhalten bleibt (Verhelst et al., 2015). Aus dem Proteingemisch wurden 20 µL Lysatprobe entnommen und mit 10 µL 3x SDS-Probenpuffer versetzt. Vor Hinzugabe zu den Zelllysaten wurden die GFP-Trap\_A-beads dreimal gewaschen, um das Ethanol des Lagerungspuffers zu entfernen und die *beads* zu äquilibrieren. Dazu wurden 20 µL *beads* pro Ansatz und 1 mL eiskalter Waschlösung in ein Reaktionsgefäß gegeben und bei jedem Waschschrift bei 3500 g für 4 min und 4°C zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Zelllysate zu den Beads gegeben. Die Präzipitation erfolgte für 1 h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurden die *beads* anschließend fünfmal gewaschen. Dazu wurden die Proben auf Mobicol-Säulchen überführt und viermal mit Waschlösung

und einmal mit PBS gewaschen. Dazwischen erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C und 3500 g für 30 sec. Danach wurden 30 µL 2x SDS-Probenpuffer zu den *beads* gegeben. Um die Antikörper-Protein-Komplexe zu eluieren, wurden die Säulchen mit einer Kappe verschlossen und in einem Wasserbad bei 95°C für 7 min aufgeköcht. Die Kappe wurde vorsichtig abgenommen und die präzipitierten Proteine wurden bei 17.000 g in ein neues Reaktionsgefäß eluiert. Bis zur weiteren Analyse mittels SDS-Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot und Immundetektion wurden die Proben bei -20°C eingefroren. Als Negativkontrolle wurden geblockte Agarose-*beads* (bab.20) ohne Einzeldomänenantikörper verwendet. Bei der Durchführung der Immunpräzipitation wurden die GFP-Trap\_A-*beads* und die bab.20-*beads* gleich behandelt.

#### Lysepuffer (pH 8)

50 mM	Tris pH 8
150 mM	NaCl
5 mM	EDTA
1%	NP-40

Die Zugabe von 25 mM NEM (2 M NEM Stocklösung frisch und kurz vor dem Versuch in 100% Ethanol vorbereiten) und PI-Mix) erfolgte kurz vor der Lyse der Zellen.

#### Waschpuffer (pH 8)

50 mM	Tris pH 8
500 mM	NaCl
5 mM	EDTA
1%	NP-40

### Co-Immunpräzipitation von endogenem Mx1

Für die Durchführung der Immunpräzipitation von endogenem Mx1 wurden Protein-G-markierte *Dynabeads* und das dazugehörige Immunprecipitation Kit (Invitrogen) verwendet. Bei *Dynabeads* handelt es sich um magnetische *beads*, die eine Immunpräzipitation ohne Zentrifugationschritte erlauben. Protein G ist an die magnetischen *beads* gekoppelt und besitzt eine hohe Bindeaffinität für den Fc-Teil von Immunglobulinen. Dadurch kann das Antigen am Antikörper präzipitieren und nach mehreren Waschschritten von den *beads* eluiert werden.

Für die IP wurden polare MDCK-Zellen verwendet. Die Lyse der Zellen erfolgte in 500 µL und 10 µL PI-Mix Lysepuffer. Die Lysate wurden, wie in Kapitel 2.8.1 beschrieben, hergestellt. Die Durchführung der Immunpräzipitation wurde nach Protokollangaben durchgeführt. 50 µL *Dynabeads*® Protein G wurden zunächst in ein Reaktionsgefäß gegeben. Die Entfernung des Lagerungspuffers erfolgte mit Hilfe eines Magneten, der die *beads* von der Lösung trennte. 2 µg des monoklonalen Mx1 (2G12) Antikörpers wurden zu 200 µL Bindungs- und Waschpuffer gegeben und anschließend mit den *beads* vermischt. Die *beads* wurden in dieser Lösung mit dem Antikörper auf dem Überkopfschüttler bei RT für 10 min inkubiert. Als Kontrolle wurden die *beads* mit Immunglobulin G (IgG)-Antikörpern inkubiert. Nach Entfernen des Überstandes mit Hilfe

des Magneten wurden die *beads* mit 200 µl Bindungs- und Waschpuffer gewaschen, um nicht-gebundene Antikörper zu entfernen. Die hergestellten Zelllysate wurden zu den mit Antikörpern gekoppelten Dynabeads gegeben und für 10 min auf dem Überkopfschüttler bei RT inkubiert. Die *beads* wurden anschließend dreimal mit 200 µL Waschpuffer gewaschen. Für die Elution wurden der Dynabeads®-Antikörper-Antigen-Komplex in 100 µL Waschpuffer aufgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde mit Hilfe des Magneten abgenommen. Nach Zugabe von 20 µL Elutionspuffer und zweiminütiger Inkubation bei RT wurde der Überstand, der die Proteinkomplexe enthielt, in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

#### 2.8.5.2. Membranaufreinigung und Vesikel-Immunpräzipitation

##### Membranaufreinigung mit einem Saccharose-Gradienten

Um biochemisch nachzuweisen, dass sich Mx1 in bestimmten Kompartimenten der Zellen befindet, wurden p75-GFP Vesikel durch eine Membranaufreinigung mittels Dichtegradientenzentrifugation in einem Saccharose-Gradienten mit anschließender Immunpräzipitation aufgereinigt.

Dazu wurden MDCK<sub>p75-GFP</sub>-Zellen in 10 cm Kulturschalen gesplittet und für fünf Tage kultiviert. Am Versuchstag wurden die Zellen zunächst für 2 h bei 20°C in einem CO<sub>2</sub>-begasten Brutschrank mit hoher Luftfeuchtigkeit inkubiert. Durch die Reduzierung der Temperatur auf 20°C konnte der Transport der Proteine aus dem Golgi zur Plasmamembran gestoppt werden (Griffiths et al., 1985; Kuliawat & Arvan, 1992; Simon et al., 1996). Der TGN-Block verhinderte die Mobilisierung der Membranlipide, die für die Abschnürung der Vesikel benötigt werden, was zu einer Akkumulation sekretorischer Proteine sowie der Membranproteine im TGN führte (Simon et al., 1996). Nach diesen 2 h wurde das Kulturmedium durch Medium, das 100 µg/mL Cycloheximid enthielt, getauscht und die Zellen erneut für 2 h bei 20°C inkubiert. Durch den Einsatz von Cycloheximid wurde die Proteinsynthese unterbunden, sodass sich alle synthetisierten Proteine bis zum Zeitpunkt der Zugabe im TGN ansammeln konnten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen wieder bei 37°C für 10 min inkubiert. Alle im Trans-Golgi-Netzwerk angereicherten Proteine verlassen das Kompartiment und werden zur Plasmamembran transportiert. Der TGN-Block und der darauffolgende TGN-Exit ermöglichten die Isolation einer hohen Konzentration an p75-GFP-positiven Vesikeln. Pro Zeitwert wurden sechs 10 cm Kulturschalen verwendet. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden auf Eis gestellt und einmal mit eiskaltem HB-T Puffer gewaschen. Es wurde darauf geachtet, dass der Waschpuffer fast vollständig abgesaugt wurde. Anschließend wurden 1 mL HB-T Puffer und 20 µL PI-Mix auf eine Kulturschale gegeben und mit einem Gummischaber abgelöst. Die

Zellsuspension wurde auf die nächste Platte pipettiert und es folgte das Abschaben der Zellen auf dieser Platte, bis die Zellen der sechs Kulturschalen in ein Reaktionsgefäß überführt werden konnten. Im Anschluss folgte der Aufschluss der Zellen, indem die Suspension fünfmal mit einer blauen und fünfmal mit einer gelben Mikropipetten-Spitze aufgezogen wurde. Dadurch lösten sich die einzelnen Zellen voneinander. Zusätzlich wurden die Zellen 30 Mal durch eine 23G Kanüle gezogen, um so die Zellen durch die wirkenden Schwerkkräfte aufzuschließen. Um Zelltrümmer sowie noch intakte Zellen und Zellkerne zu pelletieren, wurde die Zellsuspension bei 1000 g für 5 min und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und auf einen gekühlten Saccharose-Stufengradienten aufgetragen. Dieser wurde zuvor durch vorsichtiges Übereinanderschichten verschiedener Saccharose-Lösungen (2 M; 1,3 M, 1,16 M und 0,8 M Saccharose-Lösung) in einem Zentrifugenröhrchen hergestellt. Zentrifugiert wurde in einer Ultrazentrifuge bei 47.000 g für 150 min und bei 4°C.

Gesammelt wurden die Membranfraktionen, die sich in der Interphase zwischen der 1,3 M und 1,16 M sowie der 1,16 M und 0,8 M Saccharose-Fraktion gesammelt haben. Mit Hilfe einer Glaspipette und einer Peristaltik-Pumpe wurden die Fraktionen 2 bis 5 von oben abgenommen. Eine Fraktion bestand aus 1 mL. Die übrigen Fraktionen wurden verworfen. Für die weitere Durchführung und eine einfachere Handhabung wurden Fraktion 2 und 3 sowie Fraktion 4 und 5 in ein 2 mL Reaktionsgefäß zusammen gegeben und mit je 20 µL PI-Mix supplementiert. Zu den Fraktionen wurden 50 µL Protein-A-Sepharose (PAS) beschichtete *beads* pipettiert und für 1 h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler rotiert. Anschließend wurden die *beads* abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser *Preclearing* Schritt diente der Entfernung von Proteinen, die unspezifisch an die PAS-*beads* binden. Der Überstand wurde mit 0,6 µL des polyklonalen anti-GFP-Antikörpers versetzt. Dieser erkannte die zytoplasmatische Domäne des p75-GFPs. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C auf dem Überkopfschüttler. Durch die Assoziation des Antikörpers mit den PAS-*beads* (50 µL) konnten p75-GFP-positive Vesikel präzipitiert werden. Nach 2h wurden die *beads* mit dem HB-T Puffer sechsmal gewaschen. Die Zentrifugation wurde bei 400 g für 2 min und bei 4°C durchgeführt. Die *beads* der Fraktionen 2 und 3 sowie 4 und 5 wurden in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 20 µL 3x SDS-Probenpuffer wurden die Proben aufgekocht und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

**HB-T Puffer (pH 7,4)**

10 mM	Triethanolamin
1 mM	EDTA
250 mM	Saccharose



**Saccharose-Lösungen (pH 7,4)**

2 M

1,3 M

1,16 M

0,8 M

Saccharose, gelöst in 1 mM Mg-Acetat/ 10 mM Tris-Hcl (pH7,4)

**Membranaufreinigung mit einem Nycodenz-Gradienten**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden p75-GFP positive Membranen von MDCK<sub>p75-GFP</sub> und MDCK<sub>ΔMx1+p75-GFP</sub> Zellen aufgereinigt, um die Bindung des Motorproteins Kif5B an diese Vesikel in Anwesenheit und Abwesenheit von Mx1 zu quantifizieren. Dafür wurde ein Nycodenz-Gradient verwendet.

Verwendet wurden pro Ansatz drei 10 cm Kulturschalen mit polaren Zellen. Diese wurden zunächst für einen TGN-Block 2 h bei 20°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und Medium, das Cycloheximid (100 µg/mL) enthielt, zu den Zellen gegeben. Diese wurden für weitere 2 h bei 20°C inkubiert. Der TGN-Block erfolgte für 10 min bei 37°C. Alle Schritte der Membranaufreinigung und Vesikel-Immunpräzipitation erfolgten auf Eis oder bei 4°C. Die Zellen wurden anschließend aus dem 37°C warmen Brutschrank genommen und auf Eis gestellt. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PMEE Puffer wurden die Zellen von Platte zu Platte abgeschabt und die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß mit 10 µL PI-Mix überführt. Zum Aufschluss der Zellen wurden diese zunächst zehnmal durch eine blaue Mikropipetten-Spitze aufgezogen, dadurch lösten sich die Zellen voneinander. Außerdem wurden die Proben dann 30 Mal durch eine 26G Kanüle gezogen, was zur Zerstörung der Zellmembran führte. Die Suspension wurde für 5 min bei 2000 g und 4°C zentrifugiert, um die Zelltrümmer sowie noch intakte Zellen und Zellkerne zu pelletieren. 20 µL des Überstandes wurden mit 10 µL 3x SDS-Probenpuffer gemischt und als Lysatprobe später auf das SDS-Gel geladen. 200 µL des Überstandes wurden mit 200 µL 60% Nycodenzlösung in einem Zentrifugenröhrchen vermischt, sodass keine Schlieren mehr zu sehen waren. Diese Schicht wurde mit 600 µL 30% Nycodenzlösung und 200 µL 20% Nycodenzlösung vorsichtig überschichtet. Der darauffolgende Zentrifugationsschritt erfolgte in einer Ultrazentrifuge bei 200.000 g und 4°C im Vakuum für 2 h. Die gewünschte Membranfraktion befand sich zwischen der 20% und 30% Nycodenzschicht und wurde vorsichtig abgenommen. 20 µL wurden daraus mit 10 µL 3x SDS-Probenpuffer vermischt und als Inputproben später auf das SDS-Gel aufgetragen. Zunächst wurden zu jeder Fraktion 10 µL PI-Mix, 30 µL PAS-beads sowie 2 µL unspezifische IgG Antikörper zugegeben und für 1 h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Die beads wurden bei 3500 g für 2 min abzentrifugiert und der Überstand für die Immunpräzipitation verwendet. Daher wurden zum Überstand 30 µL PAS-beads sowie 2 µL des polyklonalen anti-GFP-Antikörpers gegeben. Die Inkubation erfolgte über

Nacht bei 4°C auf dem Überkopfschüttler. Am nächsten Morgen wurden die *beads* fünfmal mit PMEE Puffer gewaschen. Die Antikörper-Vesikel-Komplexe wurden durch Zugabe von 30 µL 3x SDS-Probenpuffer und Aufkochen bei 95°C für 7 min eluiert. Für die anschließende Analyse mittels Western Blot, wurden Lysatproben, Inputproben, *Preclearing*-Proben sowie die IP-Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen.

#### PMEE Puffer

35 mM	PIPES (7,4)
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
1 mM	EGTA
0,5 mM	EDTA
4 mM	DTT

#### 60% Nycodenz

60 g Nycodenz in PMEE Puffer gelöst

#### 30% Nycodenz

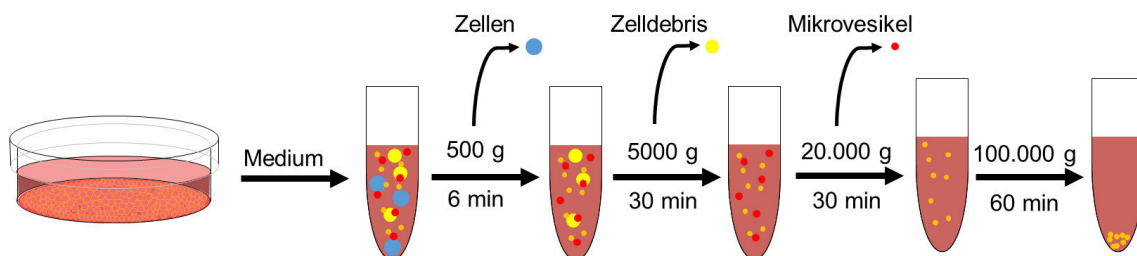
60% Nycodenz in PMEE Puffer verdünnt

#### 20% Nycodenz

60% Nycodenz in PMEE Puffer verdünnt

### 2.8.6. Isolation von Exosomen

Exosomen werden durch Fusion von Multivesikulären Körperchen mit der Zellmembran in den extrazellulären Raum abgegeben. Von Mikrovesikeln unterscheiden sie sich vor allem in Größe und Zusammensetzung (Stahl et al., 2019) und damit in ihrem Sedimentationsverhalten. Die am häufigsten verwendete Methode zur Isolation von Exosomen aus Zellkulturüberständen ist die serielle Zentrifugation (Abb. 2.3.). Damit können tote Zellen, Zelldebris und andere größere vesikuläre Strukturen entfernt werden. Durch einen abschließenden Ultrazentrifugationsschritt werden die Exosomen pelletiert.



**Abb. 2.3. Schema der Exosomen-Präparation**

Durch serielle Zentrifugationsschritte können Exosomen (orange) aus dem Zellkulturüberstand isoliert werden.

Für die Präparation von Exosomen wurden je drei 10 cm Kulturschalen polarer MDCK-Zellen dreimal mit PBS gewaschen und über Nacht mit je 10 mL Medium im Brutschrank inkubiert. Dieses enthielt alle Zusätze sowie FKS, das zuvor bei 100.000 g für 68 min abzentrifugiert und anschließend sterilfiltriert wurde, um die im FKS enthaltenen Exosomen zu entfernen. Am Tag des Versuches wurde das Kulturmedium aller drei Kulturplatten abgenommen und in ein 50 mL Falcon überführt. Alle Schritte wurden dann bei 4°C durchgeführt. Durch eine sechsminütige Zentrifugation bei 300 g wurden tote Zellen entfernt. Der Überstand wurde in ein neues 50 mL Falcon gegeben und bei 5000

g für 30 min zentrifugiert, um Zelldebris zu pelletieren. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand in neue 2 mL Reaktionsgefäße gleichmäßig aufgeteilt. Um Mikrovesikel und andere, größere Membranfragmente zu entfernen, wurde das Medium für 30 min bei 20.000 g zentrifugiert. Im darauffolgenden Schritt erfolgte die Ankonzentrierung des Mediumüberstandes mit Hilfe von Amicon Ultra-15 100K Filtereinheiten bei 3900 g. Der ankonzentrierte Rest wurde daraufhin in 1,5 mL Polyallomer-Reaktionsgefäße überführt. Das Pelletieren der Exosomen erfolgte bei 100.000 g für 68 min. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und nach dem Waschen der Exosomen durch Zugabe von 1,5 mL eiskaltem PBS<sup>++</sup> erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Um die Zusammensetzung der Exosomen mittels Western Blot zu untersuchen, wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 30 µL in 1x SDS-Probenpuffer durch Vortexen resuspendiert.

#### **2.8.7. Sekretionsstudie**

Für die Untersuchung der apikalen und basolateralen Sekretion von löslichen Proteine wurden MDCK-Zellen fünf Tage auf PET-Filtern in 6-Lochschalen kultiviert. Dadurch können die in das jeweilige Medium sekretierten Proteine über einen bestimmten Zeitraum gesammelt und anschließend analysiert werden.

Vor dem Versuch wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die apikale Membran mit 750 µL Medium und die basolaterale Membran mit 1500 µL Medium inkubiert. Das Medium enthielt dabei kein FKS. Nach einer zwei-, vier- oder sechsständigen Inkubation wurde das gesamte Medium abgenommen, auf Eis gestellt und mit 2% (v/v) PI-Mix versetzt. Anschließend wurden das Medium 5 min bei 500 g und 4°C zentrifugiert, um tote Zellen und Zelldebris zu entfernen. Die Überstände wurden in ein neue Reaktionsgefäße überführt. Für die Sekretionsstudie mit Clusterin/gp80 wurden 15 µL des apikalen Mediums und 30 µL des basolateralen Mediums mit SDS-Probenpuffer versetzt. Um Proteine, die in geringeren Mengen sekretiert werden, untersuchen zu können, wurden 500 µL des apikalen Mediums und 1000 µL des basolateralen Mediums mit Hilfe von Amicon Ultra 0,5 mL 10 K Zentrifugenfiltern bei 17.000 g und 4°C für 30 bis 40 min eingengt. Das Konzentrat wurde mit SDS-Probenpuffer versetzt und komplett bei der anschließenden SDS-PAGE aufgetragen. Für die Herstellung der Zellysate wurden die Zellen auf Eis zweimal mit eiskaltem PBS<sup>++</sup> gewaschen, mit 10 µL PI-Mix versetzt und in 500 µL Lysepuffer lysiert (siehe Kapitel 2.8.1). Sowohl die Lysatproben als auch die Mediumproben wurden zusammen in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert.

### 2.8.8. Fraktionierung von löslichem und polymerisiertem Tubulin

Die Fraktionierung von löslichem und polymerisiertem Tubulin wurde, wie bereits beschrieben (Zink et al., 2012), weiterentwickelt und durchgeführt. Mit Hilfe dieses Fraktionierungsversuches ist es möglich, das Verhältnis von polymerisiertem bzw. löslichem Tubulin zur Gesamtzahl an Tubulin zu analysieren.

Dazu wurden zunächst  $3 \times 10^6$  Zellen jeder Zelllinie ein und fünf Tage vor Versuchsbeginn auf eine 10 cm Kulturschale ausgesät, um ein einheitliches Wachstumsverhalten aller Zelllinien zu gewährleisten. Zu Beginn des Versuchs wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und trypsinisiert, bis sich alle Zellen komplett abgelöst haben. Tubulin polymerisiert bei einer Temperatur von 37°C. Aus diesem Grund wurden ab diesem Schritt ausschließlich auf 37°C vorgewärmte Puffer verwendet, um die Depolymerisation des Tubulins zu verhindern. Die Zellen wurden in 8 mL vorgewärmtem Medium mit 30 mM HEPES (pH 6,1) aufgenommen und die Zellzahl, wie in Kapitel 2.5.5 beschrieben, bestimmt. Die kleinste, gezählte Anzahl an Zellen wurde dann als Ausgangszellzahl verwendet. Für alle anderen Versuchsansätze wurden die Volumina mit der Ausgangszellzahl angepasst, um gleiche Mengen an Zellen für den Versuch zu verwenden. Anschließend wurden die Zellen bei 100 g für 5 min pelletiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in 1 mL vorgewärmtem Medium/30 mM HEPES (pH 6,1) aufgenommen und in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 200 g für 1 min. Der Überstand wurde wiederum verworfen und die Zellen in 500 µL vorgewärmtem Medium/30 mM HEPES (pH 6,1) aufgenommen. Es folgte ein 15-minütiger Inkubationsschritt bei 37°C. Darauffolgend wurden die Zellen erneut bei 200 g für 1 min abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen des Zellpellets mit warmen PBS wurden die Proteine in 200 µL Fraktionierungspuffer mit 10 µL PI-Mix aufgenommen. Die Zellyse erfolgte bei 37°C für 10 min. Zur Fraktionierung von löslichem und polymerisiertem Tubulin wurden die Proben für 2 min bei 7800 g zentrifugiert. 150 µL des Überstandes, welches das lösliche Tubulin enthielt, wurden abgenommen. Das verbleibende Pellet mit dem polymerisierten Tubulin wurde dreimal mit warmen PBS gewaschen. Daraufhin wurden 200 µL 2x SDS-Probenpuffer hinzugegeben und für 5 min bei 95°C aufgekocht. Um das vollständige Lösen des Pellets zu bewirken, wurden zusätzlich 200 µL 10% SDS hinzugegeben und die Proben erneut für 10 min bei 95°C aufgekocht. Für die SDS-Gelelektrophore wurden 2 µL der löslichen Fraktion, versetzt mit 8 µL 2x SDS-Probenpuffer, sowie 30 µL der polymerisierten Fraktion verwendet.

**Fraktionierungspuffer**

50 mM	PIPES (pH 6,9)
50 mM	HEPES
1 mM	EDTA
2 mM	MgCl <sub>2</sub>
2 M	Glycerol
2%	Triton X-100

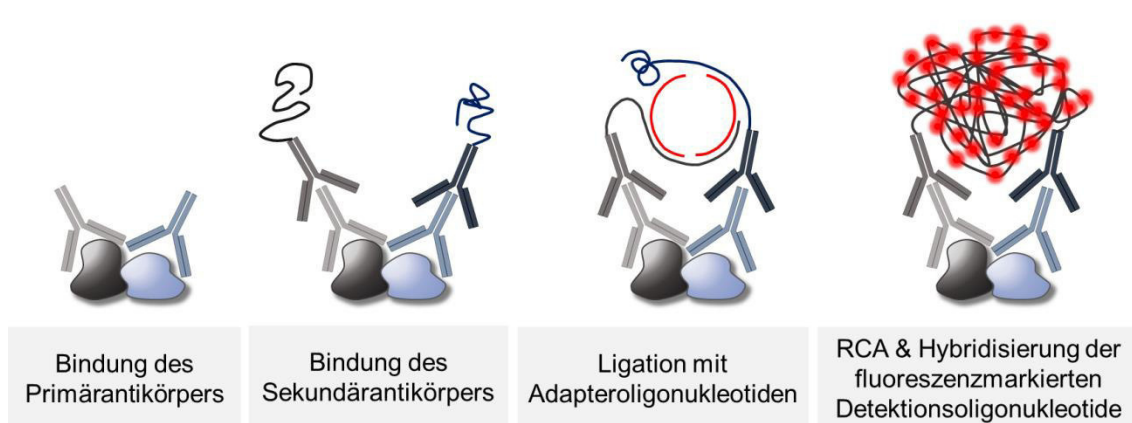
**2.9. Fluoreszenzmikroskopische Methoden****2.9.1. Immunfluoreszenzfärbung an Zellen**

Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung wurden die Zellen auf Deckgläschen oder Filtereinsätzen bis zum jeweiligen Tag kultiviert. Bevor die Zellen mit 4% Paraformaldehyd (PFA) für 20 min oder eiskaltem Methanol für 5 min fixiert werden konnten, wurden diese zunächst zweimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen. Nach dem Fixierschritt wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen. Bei den Zellen, die mit PFA fixiert wurden, folgte für 20 min bei RT die Permeabilisierung mit 0,1% oder 0,2% Triton X-100/PBS<sup>++</sup>. Um unspezifische Bindungsstellen zu entfernen, wurden die Zellen nach einem weiteren Waschschrift mit 5% (v/v) Ziegenserum/ PBS<sup>++</sup> oder 1% (v/v) BSA/PBS<sup>++</sup> für 1 h bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Blocklösung abgesaugt und der Primärantikörper, welcher in der jeweiligen Blocklösung verdünnt war, für 2h bei RT oder über Nacht bei 4°C zu den Zellen gegeben. Nach viermaligem Waschen mit PBS<sup>++</sup> folgte die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper für 1 h bei RT im Dunkeln. Dieser wurde in PBS<sup>++</sup> verdünnt. Um F-Aktin sichtbar zu machen, wurden die Zellen 20 min mit Phalloidin-Alexa 546 inkubiert. Daraufhin wurden die Deckgläschen erneut gewaschen und es folgte die Färbung der Zellkerne mit Höchst33342 (1:2000 in PBS) für 10 min. Nachdem die Zellen viermal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen wurden, folgte das Eindeckeln der Deckgläschen in Mowiol auf einen Objektträger. Im Fall der Kultivierung der Zellen auf Filtereinsätzen wurden die Filter mit einem Skalpell vorsichtig ausgeschnitten und mit der zellbewachsenen Seite nach oben auf einen Objektträger gelegt. Anschließend wurde ein Deckgläschen mit Mowiol auf den Filter gelegt. Zur Überprüfung wurde immer eine Negativkontrolle, die nur mit den jeweiligen Sekundärantikörpern behandelt wurde mitgeführt, um so die unspezifische Bindung des Zweitantikörpers auszuschließen.

**2.9.2. *In situ* Proximity Ligation Assay**

Mit Hilfe des *in situ* Proximity Ligation Assays (*in situ* PLA; Olink Biosciences) lässt sich die Interaktion bzw. räumliche Nähe von zwei Proteinen innerhalb einer Zelle detektieren (Söderberg et al., 2006). Es handelt sich dabei um eine immunozytochemische Methode. Ähnlich zur Immunfluoreszenz werden die fixierten und permeabilisierten Zellen mit zwei

Primärantikörpern, die gegen die Zielproteine oder Protein-Modifikationen gerichtet sind und aus verschiedenen Spezies stammen, inkubiert (Abb. 2.4.).



**Abb. 2.4. Ablauf des in situ Proximity Ligation Assay**

Zu Beginn werden die möglichen Interaktionspartner mit spezifischen Erstantikörpern markiert. Danach erfolgt die Bindung der Zweitantikörper, an die jeweils ein Oligonukleotid gebunden ist. Diese können nach Zugabe der Adapteroligonukleotide zu einem zirkulären DNA-Strang ligiert werden. Abschließend wird dieser Strang mit einer DNA-Polymerase durch RCA amplifiziert, während fluoreszenzmarkierte Detektionsnukleotide eingebaut werden. Voraussetzung ist, dass sich beide Proteine in einer Entfernung <40 nm befinden (modifiziert nach: Thomas & Legembre, 2017).

An die Sekundärantikörper, welche an die Primärantikörper binden, sind kurze Oligonukleotide gebunden. Befinden sich beide Proteine in räumlicher Nähe (bis 40 nm), können die gebundenen Oligonukleotide nach Zugabe von Adapteroligonukleotiden miteinander hybridisieren. Nach der Ligation werden sie zu einem zirkulären DNA-Strang vereinigt. Bei der Amplifikationsreaktion dient der gebildete DNA-Strang als Matrize, der nach Zugabe von einer DNA-Polymerase und von Nukleotiden durch eine *rolling circle* Amplifikation (RCA) hundertfach repliziert. Aufgrund der Hybridisierung von fluoreszenzmarkierten Detektionsoligonukleotiden an die amplifizierte DNA wird eine Proteininteraktion als fluoreszierendes Signal im Mikroskop sichtbar. Ein großer Vorteil dieser Methode ist die Quantifizierbarkeit der Interaktion zweier Zielproteine sowie die Bestimmung der subzellulären Lokalisation der Interaktion. Außerdem zeichnet sich der PLA durch seine hohe Sensitivität und Spezifität aus. Es können schwache und instabile Interaktionen nachgewiesen werden, weshalb keine ektopische Überexpression der Proteine notwendig ist. Der *in situ* PLA ist aus diesen Gründen besonders geeignet, um die Interaktion von (endogenen) Proteinen in der Zelle nachzuweisen und diese Methode unterstützt die biochemisch und *in vitro* nachgewiesenen Proteininteraktionen (z.B. durch Co-Immunpräzipitationen). Wegen der hohen Sensitivität bedarf der *in situ* PLA eine Reihe von Kontrollen. Die Durchführung des *in situ* PLA erfolgte nach den Angaben des Herstellers (OLink Bioscience).

**Waschpuffer A** (pH 7,5), sterilfiltriert  
 10 mM Tris/Cl  
 150 mM NaCl  
 0,5 mM EDTA  
 0,5% (v/v) NP-40

**Waschpuffer B** (pH 7,5), sterilfiltriert  
 10 mM Tris/Cl  
 150 mM NaCl  
 0,5 mM EDTA

### 2.9.3. Lebendzell-Mikroskopie

Einige Experimente, wie die Untersuchung der Bewegung von Transportvesikeln, sind nur durch die Analyse der Zellen in lebendem Zustand möglich. Durch die Fusion der zu untersuchenden Zielproteine mit fluoreszierenden Proteinen, wie GFP, kann die Lokalisation und das Verhalten des Zielproteins direkt untersucht werden. Für die Lebendzell-Mikroskopie wurde das Leica DMI6000B Epifluoreszenzmikroskop ausgestattet mit einem HCX PL APO 100x/1,47 Öl Objektiv verwendet. Vor Beginn des Versuchs wurde der Heizeinsatz der Klimakammer eingeschaltet und auf 37°C vorgeheizt. Das System innerhalb der Klimakammer blieb während der Aufnahmen konstant bei 37°C.

Zur Analyse der Dynamik von Mx1-GFP positiven Strukturen in Abhängigkeit des Tubulins- oder Aktin-Zytoskeletts, wurden MDCK<sub>Mx1-GFP</sub> Zellen auf Deckgläschen ausgesät und am jeweiligen Versuchstag mit Nocodazol (s. Kapitel 2.6.2) behandelt. Die Deckgläschen mit den Zellen wurden zunächst kopfüber auf das Deckglas einer Bacher-Kammer gelegt. Die Kammer war mit vorgewärmten MEM-Medium (ohne Phenolrot), sowie mit 5% FKS und 100 mM HEPES zur Pufferung gefüllt. Die Untersuchung der Nocodazol-behandelten Zellen erfolgte in andauernder Anwesenheit des Benzimidazols. Die Aufnahmen wurden über eine Zeitspanne von 404s mit der integrierten Software (Leica Microsystems LAS AF) gesammelt. Alle 6,513s wurde ein Bild festgehalten. Insgesamt 62 Bilder pro Zellen wurden aufgenommen. Anschließend erfolgte die Auswertung mit Hilfe der Imaris 8.1.2. Software (Bitplane). Die Detektion der Vesikel und Verfolgung der zurückgelegten Strecken erfolgte automatisch durch folgende Imaris Parameter: geschätzter Durchmesser: 0,921 µm, maximale Entfernung: 1,0 µm, maximaler Abstand: 1. Angewandt wurde der *autoregressive motion* Algorithmus. Außerdem wurden nur Vesikel in die Auswertung mit einbezogen, die länger als 189 s von der Software erkannt wurden.

Für die Lebendzellbeobachtung der MDCK<sub>Mx1-GFP</sub>, MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP</sub> oder MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP K549-552</sub> Zellen wurden diese auf *WillCo-dish*®-Glasboden-Petrischalen (Willco) oder Deckgläschen ausgesät und für 24 h kultiviert. Für die Aufnahmen wurde *Life Cell Imaging* Medium (Invitrogen) verwendet. Für Vergleichsstudien wurden MDCK<sub>Mx1-GFP</sub> Zellen in 8-Lochschalen mit Glasboden (ibidi) ausgesät und 24 h kultiviert. Direkt nach der Durchführung der Lebendzell-Mikroskopie wurden die Zellen mit 4% PFA

fixiert, mit den entsprechenden Antikörpern immungefärbt und mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert.

#### **2.9.4. Total Internal Reflection Fluorescence-Microscopy**

Bei der TIRF-Mikroskopie (engl.: *Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*) ist es möglich, membrannahe, intrazelluläre Regionen und Prozesse zu visualisieren. Im Gegensatz zur Epifluoreszenzmikroskopie, bei der das Anregungslicht das gesamte Präparat durchleuchtet und Fluorophore innerhalb und außerhalb der Fokusebene angeregt werden, wird bei der TIRF-Mikroskopie nur eine dünne Schicht nahe dem Deckglas angeregt. Das Prinzip der Totalreflexion wird hierbei ausgenutzt. Dabei trifft ein zur Anregung verwendeter Lichtstrahl in einem bestimmten Winkel auf die Glasfläche. Ein Teil des Lichts wird an der Grenzfläche zwischen dem Deckglas und dem wässrigen Medium reflektiert. Ein anderer Teil des Anregungslichts wird gebrochen und kann das Deckglas passieren. Übersteigt der Einfallswinkel den kritischen Winkel  $\alpha_c$ , wird das Anregungslicht komplett reflektiert. Voraussetzung ist aber, dass das Licht von einem Medium mit einem höheren Brechungsindex auf ein Medium mit niedrigerem Brechungsindex trifft. Trotz der totalen Reflexion dringen Photonen in das wässrige Medium ein, wodurch das sogenannte evaneszente Feld erzeugt wird. Die evaneszente Welle breitet sich parallel zur Oberfläche aus und nimmt mit wachsendem Abstand von der Grenzfläche exponentiell ab. Nur Fluorophore, die sich innerhalb des evaneszenten Feldes befinden, werden angeregt. Durch dieses Prinzip, wird die Eindringtiefe limitiert und es kann ein Bereich zwischen 70 und 300 nm detektiert werden. Durch die Unterdrückung der Anregung der Fluorophore außerhalb dieser dünnen Schicht bietet die TIRF-Mikroskopie eine hohe Auflösung in z-Richtung durch ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis.

Diese Methode wurde zur Untersuchung der Dynamik von Mikrotubuli eingesetzt. Dazu wurde das DMI 6000 B Fluoreszenzmikroskop, ausgestattet mit dem Leica TIRF-System AM TIRF MC und einem Leica HCX PL APO Objektiv mit 100-facher Vergrößerung, verwendet. Die Software Leica LAS AF diente zur Aufnahme von TIRF-Bildern und Videos. Die Tiefe des evaneszenten Feldes wurde durch den Einfallswinkel bestimmt, hängt aber auch von dem Verhältnis beider Brechungsindizes und der Wellenlänge des Lichts ab. Als Lichtquelle diente der Diodenlaser mit definierter Anregungswellenlänge von 561 nm. Die Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden diese in eine Bachofer-Kammer, die mit vorgewärmten MEM-Medium (ohne Phenolrot), 5% FKS und 100 mM HEPES zur Pufferung gefüllt war, kopfüber gelegt und mikroskopiert.



### 2.9.5. Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)

Die FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) Methode ist eine fluorezenzbasierende Methode, die es ermöglicht, dynamische Prozesse in lebenden Zellen zu untersuchen und zu quantifizieren. Die ersten FRAP-Experimente wurden Mitte der 1970er Jahre durchgeführt. Dabei wurde die laterale Beweglichkeit von Molekülen in Lipidmembranen gemessen (Axelrod et al., 1976). FRAP hat sich inzwischen als verbreitete Methode zur Messung von Proteindynamiken etabliert. Ausgangspunkt der Analysen sind lebende Zellen, die ein fluoreszierendes Fusionsprotein exprimieren. Die Fluorophore der Probe werden innerhalb einer ausgewählten *Region Of Interest* (ROI) durch Bestrahlung mit hoher Laserenergie irreversibel gebleicht. Im Anschluss werden der Wiedereintritt der fluoreszierenden Moleküle und die Erholung der Fluoreszenzintensität im gebleichten Areal zeitlich aufgenommen und gemessen. Die Regeneration der Fluoreszenz nach dem Bleichprozess gibt zum einen Auskünfte über die Kinetik des Proteins und zum anderen Informationen darüber, durch welche Prozesse (Diffusion oder dem aktiven Transport mit Hilfe weiterer Proteine) die Fluoreszenzerholung stattfindet.

Für die Durchführung der FRAP-Analyse wurden COS-7 Zellen, die auf Deckgläschen wuchsen, mit Mx1-GFP oder Mx1-eGFP<sub>K549-552A</sub> transfiziert. Am Folgetag wurden die Deckgläschen kopfüber in *WillCo-dish*®-Glasboden-Petrischalen, die mit *Life Cell Imaging* Medium (Invitrogen) gefüllt waren, platziert. Die Experimente wurden bei 37°C an einem Leica DMI8 S Mikroskop durchgeführt. Das Mikroskop war mit einer *infinity laser focal scanning* (FS) Einheit, einem HC PL Apo 100×/1.47 Öl Objektiv (Leica Microsystems) und einer adaptiven Fokuskontrolle (*Adaptive Focus Control*, AFC) ausgestattet. Die Fluorophore wurden innerhalb der ausgewählten ROI mit der Anregungswellenlänge 488 und 75% Laserenergie gebleicht. Vor dem Bleichvorgang wurden 20 Bilder mit einer Bildaufnahmerate von 0,5s aufgenommen, um die Fluoreszenzintensität vor dem Bleichen zu bestimmen. Nach dem Bleichprozess wurden 220 Bilder im Abstand von 3s aufgenommen, um die Regeneration der Fluoreszenz im definierten Bereich zu messen. Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität innerhalb der ROI ließ sich anhand der aufgenommenen Bilderserie mit Hilfe der Leica LAS X Software, Microsoft Excel und GrapPad Prism quantifizieren und darstellen. Für die Auswertung werden als erstes die ROIs in der aufgenommen Bildserie definiert: das gebleichte Areal als ROI1, die gesamte Zelle als ROI2 und die Region außerhalb der Zelle als ROI3. Anschließend erfolgte die Korrektur durch Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz (ROI3) von den anderen beiden Messwerten (ROI1 und ROI2):

$$I(t)_{ROI1'} = I(t)_{ROI1} - I(t)_{ROI3}$$

$$I(t)_{ROI2'} = I(t)_{ROI2} - I(t)_{ROI3}$$

Anschließend wurde eine Doppelnormalisierung der Daten durchgeführt. Dadurch wird eine Korrektur der unterschiedlichen Startintensitäten in ROI1, durch Teilung der Intensitäten von ROI1 durch die durchschnittliche Intensität in ROI1 vor dem Bleichvorhang, möglich. Des Weiteren können auf diese Weise Unterschiede in der Gesamtfluoreszenz während der gesamten Dauer des Experiments korrigiert werden. Die Doppelnormalisierung besteht aus folgender Formel:

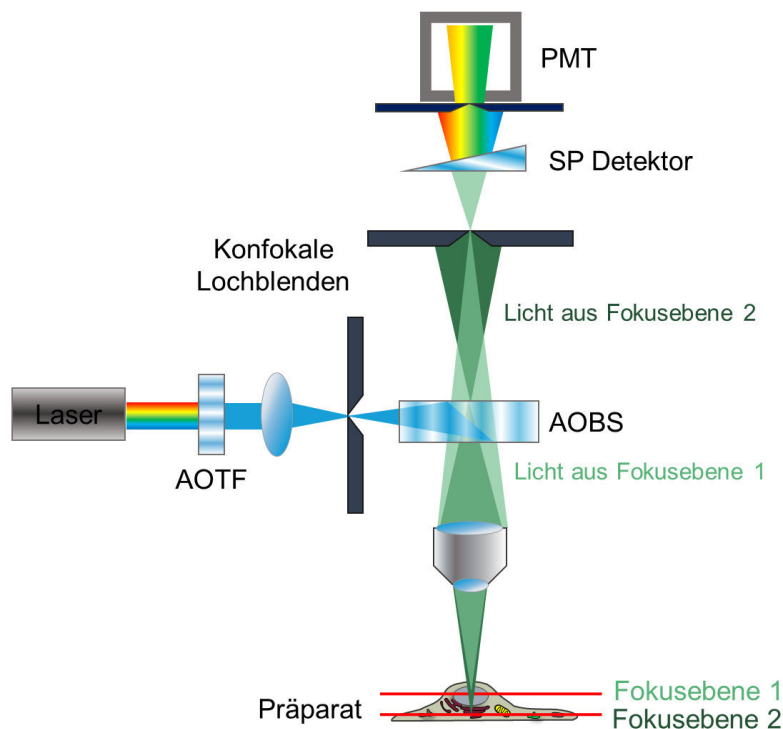
$$I(t)_{norm}^{double} = \left( \frac{\frac{1}{n_{pre}} \cdot \sum_{t=1}^{n_{pre}} I(t)_{ROI2'}}{I(t)_{ROI2'}} \right) \cdot \left( \frac{I(t)_{ROI1'}}{\frac{1}{n_{pre}} \cdot \sum_{t=1}^{n_{pre}} I(t)_{ROI1'}} \right)$$

Im Anschluss folgte eine *full-scale* Normalisierung. Damit werden Unterschiede in der Fluoreszenzintensität aller Datensätze aneinander angepasst, so dass die Daten einen We. Die *full-scale* Normalisierung wird wie folgt definiert:

$$I(t)_{norm}^{fullscale} = \frac{I(t)_{norm}^{double} - I(t_{postbleach})_{norm}^{double}}{1 - I(t_{postbleach})_{norm}^{double}}$$

### 2.9.6. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Für die fluoreszenzmikroskopischen Analyse fixierter Proben wurde die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (KLSM) verwendet. Anders als beim Epifluoreszenzmikroskop, nutzt das KLSM einen anderen optischen Aufbau (Abb. 2.5.).



**Abb. 2.5. Schematischer Aufbau eines Konfokalen Laser Scanning Mikroskops**

Zwei konfokale Lochblenden ermöglichen es Licht aus Ebenen außerhalb der Fokusebene auszublenzen. Das Mikroskop enthält außerdem einen AOTF, einen AOBS sowie einen SP Detektor.

Durch den Einsatz von zwei Lochblenden im Strahlengang wird nur das emittierte Licht der angeregten Fluoreszenzmoleküle aus der Fokusebene detektiert. Das emittierte Licht außerhalb der Fokusebene wird ausgeblendet, was zu einer Erhöhung der Auflösung führt. Dabei befindet sich eine Lochblende zwischen der Anregungslichtquelle und dem Präparat. Diese Lochblende ermöglicht die punktförmige Fokussierung des Anregungslichts auf die Probe. Trotz dieser Fokussierung würde eine Reflexion und Anregung in anderen Teilen des Präparats stattfinden. Daher ist eine zweite Lochblende (*pinhole*) zwischen dem Objekträger und dem Detektor eingebaut. Diese blendet das Streulicht aus dem Präparat aus und lässt nur das Licht aus der Fokusebene passieren. Haben die Anregungs- und die Detektionsblende den selben Fokus, sind sie konfokal. Durch diese optische Anordnung der Lochblenden ist es möglich, Fluoreszenzsignale punktförmig zu messen. Aus diesem Grund muss der Bildausschnitt des Präparats seriell abgerastert werden. Ein Bild kann aufgenommen werden, wenn der Laserstrahl in x- und y- Richtung relativ zur Probe bewegt wird.

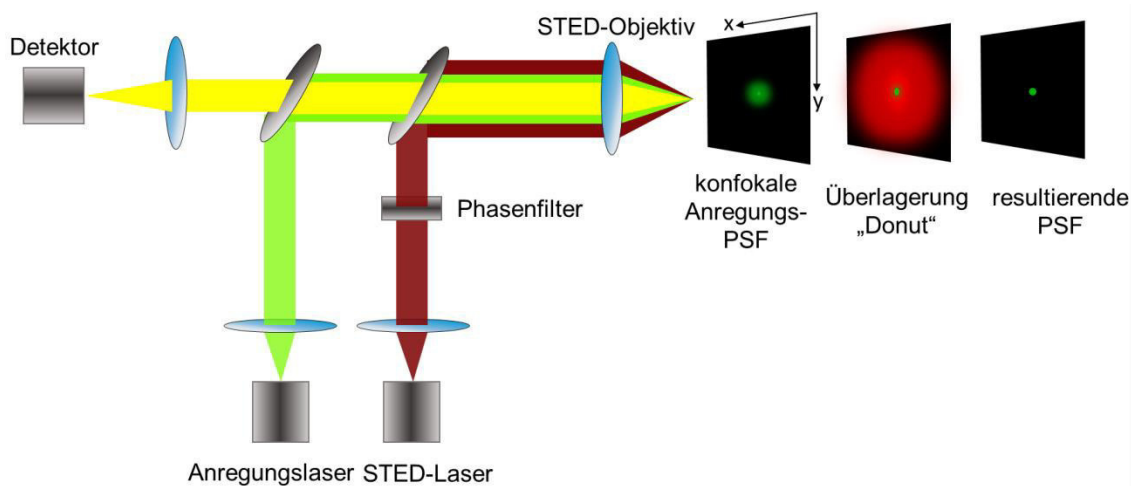
Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie wurde an einem TCS SP2 Mikroskop (Leica Microsystems) mit einem HCX PL APO CS 63x/1,40 Öl oder einem HCX PL APO CS 40x Öl Objektiv durchgeführt. Für die Anregung bestimmter Spektren wurden verschiedene Laser, wie einen Dioden-Laser, Helium-Neon-Laser und einen Argon-Ionen-Laser mit verschiedenen Wellenlängen als Lichtquelle verwendet. Um das Überschneiden der Anregungsspektren und die gleichzeitige Anregung verschiedener Fluorophore im Präparat zu verhindern, wurden die Aufnahmen im sequentiellen Modus aufgenommen. Dabei wurden die einzelnen Farbstoffe mit dem entsprechenden Laser angeregt und die Emission separat detektiert. Möglich ist dies durch ein spezielles Detektionsmodul. Es handelt sich dabei um einen Multibanddetektor, der aus einem Prisma (Spektrophotometer, SP) besteht und das emittierte Licht in ein Spektrum streut. Die unterschiedlichen Spektralbänder werden durch motorisierte Spiegel zu einem Photoelektronenvervielfacher (*Photomultiplier*, PMT) geleitet. Dieser detektiert dann die Fluoreszenz jedes einzelnen Punktes der verschiedenen Fluoreszenz-Kanäle. Das Mikroskop enthielt außerdem einen AOTF (*Acousto-Optical Tunable Filter*) und einen AOBs (*Acousto-Optical Beam Splitter*). Dies sind akustooptische Kristalle, die im Strahlengang eingebaut sind und als Strahlteiler dienen, ähnlich wie in ein dichroischer Spiegel. Die Bilder wurden mit einer Auflösung von 512 x 512 Bildpunkten aufgenommen und jede Bildzeile wurde mindestens achtmal abgerastert. Wurden lebende Zellen mit Hilfe des KLSM analysiert, wurden diese auf Deckgläschen ausgesät und mit Hilfe einer mit PBS gefüllten Bachofer-Kammer mikroskopiert.

### 2.9.7. STED-Mikroskopie

Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Mx1-positiven Strukturen entlang von Mikrotubuli wurde die Technik der STED (engl.: *Stimulated Emission Depletion*)-Mikroskopie verwendet. In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Fluoreszenzmikroskopie-Verfahren entwickelt, um die theoretisch berechnete Auflösungsgrenze von Ernst Abbé zu durchbrechen. Das Prinzip basiert dabei immer auf dem Schalten zwischen zwei molekularen Zuständen, meist einem nicht-fluoreszierenden und einen fluoreszierenden Zustand. Neben stochastischen Methoden, wie GSDIM (engl.: *Ground State Depletion Microscopy Followed by Individual Molecule Return*) gibt es auch Methoden, bei denen man angeregte Moleküle gezielte abgereggt werden. Dazu gehört die STED-Mikroskopie, welche auf der Methode der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie beruht. Das Prinzip dieser hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie-Technik wurde theoretisch 1994 durch Hell und Wichmann beschrieben und konnte wenige Jahre später praktisch umgesetzt (Klar et al., 2000). Mit einem fokussierten Laserstrahl werden Farbstoffmoleküle in der Probe angeregt (Abb. 2.6.).

Die Auflösung der Aufnahme wird dabei von der Größe des beleuchteten Punkts, der Punktspreizfunktion (engl.: *point spread function*, PSF) bestimmt. Der Schlüssel der STED-Mikroskopie liegt nun in der Verkleinerung des fluoreszierenden Bereichs durch die Bestrahlung der Probe mit zwei synchronisierten Lasern. Denn dem Impuls des Anregungslasers (grün) folgt der Impuls eines niedriger frequenten STED-Lasers (rot). Dieser wird häufig auch als Abregungslaser bezeichnet. Durch den ringförmigen STED-Strahl werden Fluorophore in der Peripherie durch stimulierte Emission abgereggt. Dadurch werden angeregte Fluoreszenzmoleküle zurück in den Grundzustand gebracht. Mit Hilfe eines Phasenmodulators wird der STED-Strahl modifiziert, so dass dieser in seinem Zentrum eine Intensität von Null aufweist. Der Abregungslaser hat also die Form eines Donuts. Auf diese Weise werden nur Photonen aus dem Fokuszentrum des Präparats emittiert. Die resultierende PSF entspricht der des Intensitätsminimums des STED-Lasers im Zentrum, wodurch eine verbesserte Auflösung erzielt wird (Klar et al., 2000).

Für die hochauflösende STED-Mikroskopie wurden die Proteine in fixierten MDCK-Zellen mittels spezifischer Primär- und Sekundärantikörper markiert (s. Kapitel 2.4.). Durchgeführt wurden die Aufnahmen an einem invertierten STED-Mikroskop (Abberior Instruments). Die Anregung fand über gepulste Laser mit den Wellenlängen 640 nm (Abberior) und 561 nm (Abberior), was die Aufnahme mehrerer konfokaler Farben ermöglichte. Der STED-Laser hatte eine Wellenlänge von 775 nm. Zusätzlich war das Mikroskop ausgestattet mit einem Öl-Immersionsobjektiv (100 x NA 1.4, Olympus).



**Abb. 2.6. Prinzip des Anregungs- und STED-Lasers**

Gezeigt ist der typische Aufbau eines STED-Mikroskops. Durch den Anregungsfilter (grün) werden Fluorophore vom Grundzustand in einen angeregten Zustand versetzt. Fallen sie zurück in den Grundzustand emittieren die Fluorophore Photonen einer charakteristischen Wellenlänge. Der ringförmige STED-Laser (rot) führt zu Unterdrückung der Fluoreszenzemission, indem dieser durch stimulierte Emission die Fluorophore dazu bringt, vom angeregten Zustand in den Grundzustand überzugehen. Lediglich Photonen aus dem Fokuszentrums der Probe werden auf diese Weise emittiert (gelb). Der rechte Teil der Abbildung veranschaulicht die Verringerung der Breite des Anregungsfokus bei steigender STED-Intensität.

## 2.10. Auswertung und Statistik

### Quantifizierung biochemischer Experimente

Die densitometrisch Quantifizierung von Western Blots wurde mit Hilfe der Software LabImage 1D (Kapekan Bio-Imaging) durchgeführt. Wichtig dabei war darauf zu achten, dass die Signale außerhalb des Sättigungsbereichs des Bildaufnahmesystems lagen. Außerdem wurde eine geeignete Reduktion des Hintergrundsignals angewandt (Basislinie oder rollender Ball). Die Normalisierung gegen konstitutiv exprimierte Protein (GAPDH und  $\alpha$ -Tubulin), die als Ladekontrolle verwendet wurden, erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel. Die berechnete Menge der detyrosinierten Menge in der polymerisierten und löslichen Fraktion der MDCK $_{\Delta TLL}$ -Zellen wurde mit dem Faktor 2,7 multipliziert, da in diesen Zellen die Menge an detyrosiniertem Tubulin um durchschnittlich um das 2,3-fache erhöht ist (s. Abb. 3.3.).

### Quantifizierung fluoreszenzmikroskopischer Versuche

Alle Kolokalisierungen der IF-Studien sowie die Quantifizierung der PLA-Versuche wurden mit Volocity Version 5 (Perkin Elmer) ausgewertet. Für die Kolokalisationsstudien wurde mit Hilfe der Volocity Software ein Messprotokoll erstellt, welches automatisch vesikuläre Strukturen bestimmt. Dabei wurden nur Strukturen ausgewertet, die eine mindestens  $0,03 \mu\text{m}^2$  groß waren. Außerdem wurden die Bereiche außerhalb der Zellgrenzen ausgeschlossen. Der Manders Kolokalisierungskoeffizient wurde für die quantitative Bestimmung von kolokalisierten Vesikeln verwendet. Eine Kolokalisation

zweier Proteine wurde gewertet, wenn  $M_x$  und  $M_y \geq 0,5$  war. Die Bestimmung der PLA-Ereignisse erfolgte ebenfalls mit einem Messprotokoll in der Volocity Software. Dabei wurden die PLA-Signale pro Zelle durch die Anzahl an Zellkernen berechnet. Analysiert wurden mindestens zehn Bilder aus drei unabhängigen Experimenten. Die 3D-Aufnahmen (Abb. 3.20. und Abb. 6.4.) wurden mit Hilfe der Leica LAS X Software dargestellt.

Die Anzahl und die Größe der Vinculin- und Paxillin-positiven fokalen Adhäsionen sowie die Größe der  $Mx1$ -GFP und  $Mx1$ -GFP<sub>K549-552A</sub>-positiven Strukturen wurden ebenfalls mit der Volocity Software ausgewertet.

Die Messung Polymerisations- bzw. Depolymerisationsgeschwindigkeit erfolgte mit Hilfe von ImageJ und von Microsoft Excel. Dazu wurde die Strecke gemessen, die ein Mikrotubulus in einem bestimmten Zeitraum zurücklegte. Die berechneten Geschwindigkeiten wurden anschließend gemittelt. Für die Analyse der Mikrotubuli-Dynamik wurden Katastrophe- sowie Depolymerisations- und Polymerisationsereignisse von verschiedenen Mikrotubuli in einem Zeitraum von 30 Sekunden gezählt (s. Abb. 3.3.).

## Statistik

Alle statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der GraphPad Prism Software. Für die Analyse wurden in der Regel aus mindestens drei unabhängigen Experimente die unter den gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt wurden, ausgewertet. Mögliche Abweichungen sind in der Bild-Legende angegeben. Für den Vergleich zweier Gruppen mit normalverteilten Messwerten wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Statistische Unterschiede zwischen zwei oder mehreren Gruppen (beispielsweise in einer Zeitreihe) wurden durch eine einfaktorielle oder zweifaktorielle Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA), gefolgt von einem Bonferroni-Post-Test bewertet. Das jeweilige Signifikanzniveau für die Abbildungen dieser Arbeit ist folgendermaßen angegeben mit: ns=nicht signifikant; \* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ . Angegeben sind immer der Mittelwert stets mit dazugehöriger Standardabweichung (*Standard Deviation*, SD).

### 3. Ergebnisse

Der Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit gliedert sich in zwei Teilbereiche. Im ersten Abschnitt soll die Rolle der Detyrosinierung, eine posttranslationale Modifikation des  $\alpha$ -Tubulins, in der Ausbildung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität sowie der Einfluss der TTL-Expression auf die Zelladhäsion und Zellbeweglichkeit in MDCK-Zellen untersucht werden. Im zweiten Abschnitt soll die Rolle der großen GTPase Mx1 im apikalen Proteintransport genauer analysiert werden.

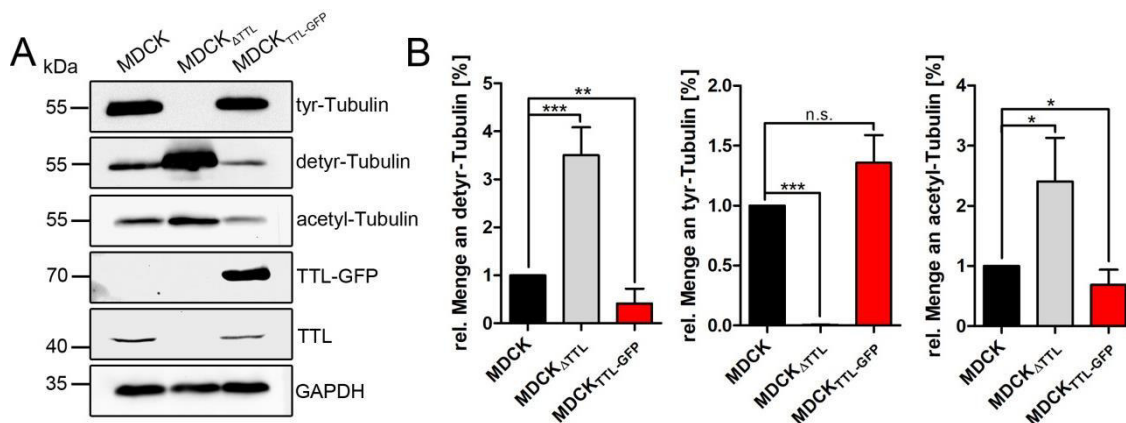
#### 3.1. Der Einfluss der Detyrosinierung auf die Zellpolarität sowie die Adhäsion und die Migration

Posttranslationale Tubulin-Modifikationen von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin üben einen regulatorischen Einfluss auf die Eigenschaften von Mikrotubuli aus. Auf diese Weise werden die Stabilität und die Funktion von Mikrotubuli sowie die Affinität der Mikrotubuli zu Motorproteinen oder anderen MAPs beeinflusst. Diese wiederum bewirken die funktionelle Vielfältigkeit der Mikrotubuli und deren Beteiligung an unterschiedlichen zellulären Prozessen (Janke & Bulinski, 2011). Für verschiedene Tubulin-Modifikationen, darunter die Tyrosinierung, die Detyrosinierung sowie die Acetylierung, ist bekannt, dass sie wichtige Faktoren bei der Polarisierung von Epithelzellen darstellen (Müsch, 2004). Daher sollte zunächst die Rolle der Detyrosinierung im Rahmen des Polarisationsprozesses von Epithelzellen und die Stabilität von Mikrotubuli, die durch die Anreicherung der Detyrosinierung bedingt wird, bestätigt werden. Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Kapiteln dargestellt.

##### 3.1.1. Der Einfluss der Tubulin Tyrosin Ligase-Expression auf das polare Wachstum

Um den direkten Einfluss der Detyrosinierung auf die Zellpolarität zu untersuchen, diente die gezielte Manipulation der TTL-Expression. Für die Überexpression der Tubulin Tyrosin Ligase wurden MDCK<sub>TTL-GFP</sub>-Zellen verwendet, welche durch die stabile Integration eines TTL-GFP Konstrukts charakterisiert sind (Zink et al., 2012). Des Weiteren konnten mit Hilfe eines CRISPR/Cas9-induzierten *Knockouts* der TTL (MDCK <sub>$\Delta$ TTL</sub>) die Auswirkungen der Herunterregulation des Enzyms analysiert werden. Zur Überprüfung der unterschiedlichen TTL-Expression und die dadurch bedingten Veränderungen der Tubulin-Modifikationen innerhalb der Zelle, wurden Lysate von polaren MDCK-, MDCK <sub>$\Delta$ TTL</sub>- und MDCK<sub>TTL-GFP</sub>-Zellen verwendet. Diese wurden im Western Blot untersucht (Abb. 3.1. A) und die jeweiligen Proteinmengen anschließend densitometrisch quantifiziert (Abb. 3.1. B).

Zunächst konnte beobachtet werden, dass der gezielte *Knockout* der TTL die Proteinmenge von sowohl de-tyr-Tubulin als auch tyr-Tubulin beeinflusst. In den TTL depletierten Zellen konnte eine 3,5-fach höhere Expression von de-tyrosiniertem Tubulin im Vergleich zu MDCK-Zellen verzeichnet werden. Des Weiteren konnte in der MDCK $\Delta$ TTL-Zelllinie ein deutlicher Verlust an tyrosiniertem Tubulin festgestellt werden. Der gegenteilige Effekt war in den MDCK $\Delta$ TTL-GFP-Zellen zu beobachten. Durch die konstante Überexpression der TTL kam es zu einer signifikanten Verringerung an de-tyrosiniertem Tubulin. Interessanterweise zeigte sich jedoch kaum eine Änderung der Menge an tyrosiniertem Tubulin. Zusätzlich wurden die Lysate auf Änderungen in der Menge von acetyliertem Tubulin getestet. Vergleicht man den Gehalt an acetyliertem Tubulin in MDCK-Zellen mit dem der Überexpressions- bzw. *Knockout*-Zelllinien konnte auch hier ein deutlicher Unterschied bemerkt werden. Der Anteil an acetyliertem Tubulin verdoppelte sich in den MDCK $\Delta$ TTL-Zellen um mehr als das Zweifache, während eine Verringerung der Acetylierung in MDCK $\Delta$ TTL-GFP-Zellen beobachtet wurde. Dies gibt einen ersten Hinweis darauf, dass die erhöhte Detyrosinierung zu einer Stabilisierung der Mikrotubuli führt.



**Abb. 3.1. Charakterisierung der MDCK-, MDCK $\Delta$ TTL- und MDCK $\Delta$ TTL-GFP-Zellen**

(A) MDCK-, MDCK $\Delta$ TTL- und MDCK $\Delta$ TTL-GFP-Zellen wurden lysiert und im Immunoblot auf die Expression von de-tyr-Tubulin, tyr-Tubulin und acetyl-Tubulin untersucht. GAPDH diente als Ladekontrolle. (B) Der relative Proteingehalt an de-tyr-Tubulin-, tyr-Tubulin und acetyl-Tubulin jeder Zelllinie wurde densitometrisch quantifiziert. Die Normalisierung erfolgte gegen GAPDH. Die Proteinmenge des jeweiligen Proteins in MDCK-Zellen entspricht 100%. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test, n=5. In Zusammenarbeit mit Manuel Müller

Der Einfluss der gesteigerten Expression der Tubulin Tyrosin Ligase auf die Zellmorphologie von MDCK-Zellen ist bereits 2012 von Zink und Kollegen festgehalten worden. Die als Folge der TTL-Überexpression auftretende Reduzierung der de-tyr-Tubulin Menge führte zu einer spezifischen morphologischen Veränderung. MDCK $\Delta$ TTL-GFP-Zellen zeigten nach Aussaat ein Wachstum in deutlich abgegrenzten Inseln und ein verändertes Höhenwachstum (Zink et al., 2012 und Abb. 3.2. A). Der gravierende Einfluss der TTL-Überexpression auf die Zellmorphologie gab den

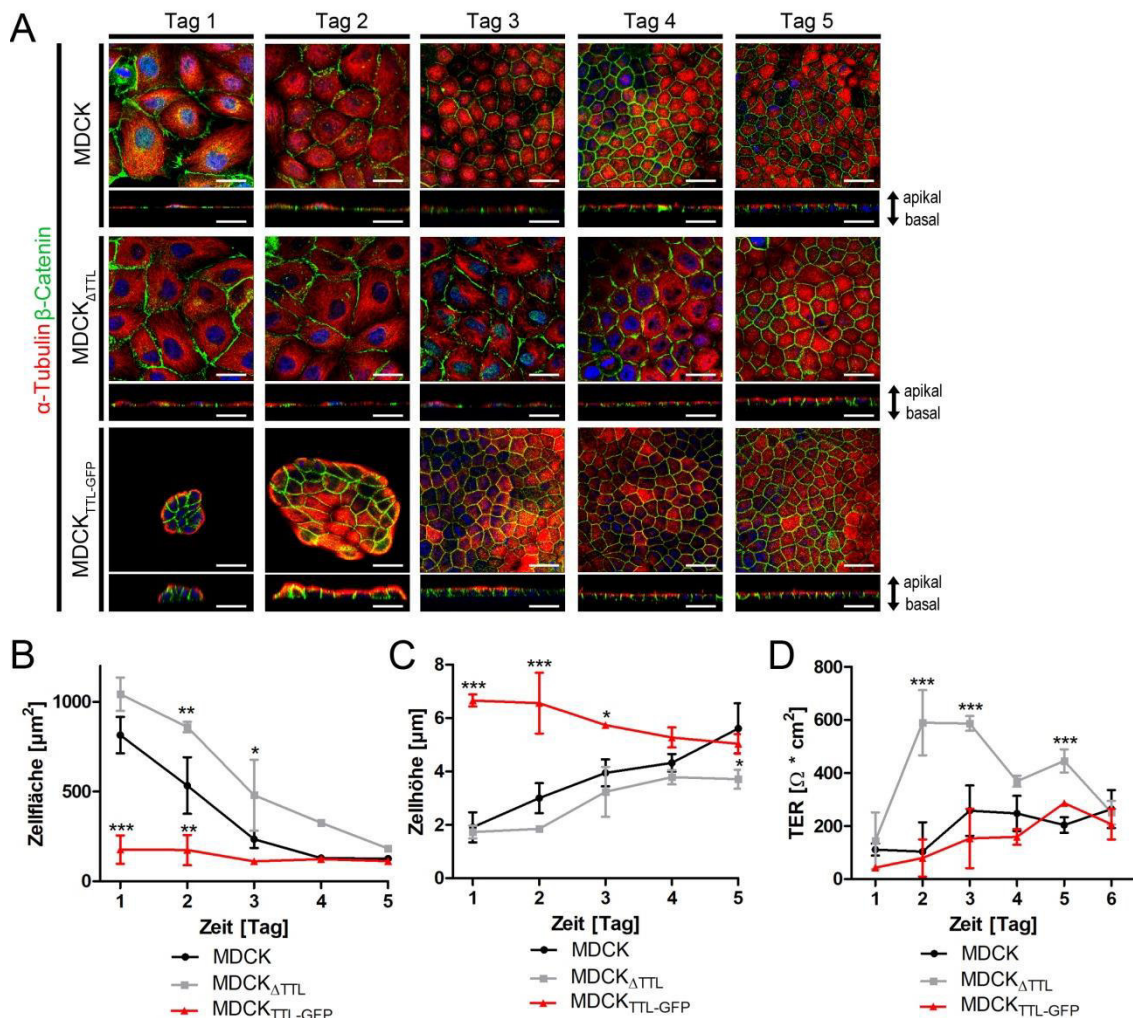


Ansatzpunkt für die Analyse von Zellen, in denen die Expression der TTL ausgeschaltet ist. Um festzustellen, ob in diesen Zellen der gegenteilige Effekt eintritt, sollte der Polarisationsfortschritt von MDCK<sub>ΔTTL</sub>-Zellen mit dem der MDCK- und MDCK<sub>TTL-GFP</sub>-Zellen verglichen werden.

Bei diesem Zeitverlaufs-Versuch zeigte sich das typische flach-gestreckte Erscheinungsbild unpolarer MDCK-Zellen (Abb. 3.2. A). Ebenfalls konnte beobachtet werden, dass die TTL-überexprimierenden MDCK-Zellen kurz nach Aussaat die bereits beschriebene charakteristische Inselbildung mit einer hoch-gestreckten Morphologie ausbildeten. Vergleicht man die Zellflächen der beiden Zelllinien miteinander so wird deutlich, dass MDCK<sub>TTL-GFP</sub>-Zellen im Durchschnitt deutlich kleiner waren als MDCK-Zellen (Abb. 3.2. B). Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits dokumentiert (Zink et al., 2012). Im Gegensatz dazu wuchsen die MDCK<sub>ΔTTL</sub>-Zellen ähnlich flach und lang-gestreckt wie die MDCK-Zellen. Jedoch zeigten die TTL-Knockout-Zellen eine etwas größere Zellfläche. Bis zur Ausbildung der Polarität verkleinerte sich die Grundfläche der MDCK-Zellen sowie der MDCK<sub>ΔTTL</sub>-Zellen kontinuierlich, was vor allem durch die quantitative Auswertung der Zellfläche deutlich wird. Abb. 3.2. B veranschaulicht auch, dass sich die Grundfläche der MDCK<sub>TTL-GFP</sub>-Zellen im Verlauf des Polarisationsprozesses im Gegensatz dazu nicht verändert. Darüber hinaus stellte sich die Frage, wie sich die komplette Reduktion der TTL-Expression und der damit einhergehende Anstieg an detyrosiniertem Tubulin auf die Höhe der Epithelzellen auswirken. Sowohl MDCK- als auch MDCK<sub>ΔTTL</sub>-Zellen zeigten eine kontinuierliche Steigerung der Zellhöhe im Verlauf der Polarisierung (Abb. 3.2. C). Kurz nach der Aussaat betrug die durchschnittliche Höhe beider Zelllinien ca. 2  $\mu\text{m}$  und sie steigerte sich, bis die MDCK- bzw. MDCK<sub>ΔTTL</sub>-Zellen eine Höhe von 5  $\mu\text{m}$  bzw. 4  $\mu\text{m}$  am fünften Tag erreicht hatten. Die MDCK<sub>TTL-GFP</sub>-Zelllinie zeigte das bereits beschriebene veränderte Höhenwachstum (Zink et al., 2012). Die maximale Höhe dieser Zellen lag bei ca. 7  $\mu\text{m}$  am ersten Tag nach Aussaat. Nach Ausbildung der Polarität konnte ein deutliches Abflachen der Zellen beobachtet werden, da diese am fünften Tag eine ähnliche Zellhöhe wie die MDCK- bzw. MDCK<sub>ΔTTL</sub>-Zellen erreichten.

Ebenso waren Veränderungen in der Ausbildung des Zellmonolayers Gegenstand der Untersuchungen. Diese wurden durch TER-Messungen bestimmt (Abb. 3.2. D). Das Wachstumsverhalten der MDCK-Zellen äußerte sich in einem schrittweisen Anstieg der TER-Werte während des Polarisationsprozesses. Nachdem ein dichter Zellrasen gebildet wurde, zeigte sich ein Plateau mit einem TER-Wert von ca. 300  $\Omega\cdot\text{cm}^2$ , welches über drei bis vier Tage stabil blieb. Dieser gemessene TER-Wert in polaren MDCK-Zellen entspricht dem in der Literatur beschriebenen TER-Wert für MDCK Typ II Zellen (Barker & Simmons, 1981; Dukes et al., 2011). Der TER nahm in den MDCK<sub>TTL-GFP</sub>-

Zellen hingegen langsamer zu, erreichte aber ebenfalls ein Maximum von ca.  $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$  nach Ausbildung der Polarität. Dies lässt auf eine Verzögerung in der Ausbildung einer intakten Zellmonoschicht schließen. Währenddessen war ein dramatischer Anstieg des TER-Werts bei den MDCK $_{\Delta\text{TTL}}$ -Zellen am zweiten Tag nach Aussaat zu beobachten. Allerdings kam es am vierten Tag zum Absinken der gemessenen TER-Werte und es wurde ebenfalls ein Wert von ca.  $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$  erreicht. Das spricht für eine weiterhin intakte Zellschicht, die von MDCK $_{\Delta\text{TTL}}$ -Zellen ausgebildet wurde. Dieses Ergebnis lässt eine beschleunigte Monolayer-Bildung vermuten und deutet darauf hin, dass scheinbar bereits unpolare MDCK $_{\Delta\text{TTL}}$ -Zellen ein dichtes Epithel ausgebildet haben.



**Abb. 3.2. Veränderungen in der Morphologie nach Modulation der TTL-Expression**

(A) Auf PET-Filtern gewachsene MDCK-, MDCK $_{\Delta\text{TTL}}$ - und MDCK $_{\text{TTL-GFP}}$ -Zellen wurden an den jeweiligen Tagen fixiert und gegen  $\alpha$ -Tubulin (Alexa Fluor 647) und  $\beta$ -Catenin (Alexa Fluor 555) gefärbt. Zusätzlich wurden Aufnahmen in der x/z-Ebene aufgenommen. Zellkerne wurden mit Hoechst33342 (blau) gefärbt. Maßstab: 25  $\mu\text{m}$ . Quantifizierung der Zellhöhe (B) und Zellfläche (C) aus Experimenten wie in A. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einer zweifaktoriellen ANOVA und Bonferroni-Post-Test, n=3. (D) Messung des transepithelialen Widerstands (TER) von auf PET-Filtern gewachsenen MDCK-, MDCK $_{\Delta\text{TTL}}$ - und MDCK $_{\text{TTL-GFP}}$ -Zellen für sechs Tage. Die Messung wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem zweifaktorieller ANOVA und Bonferroni-Post-Test.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die bereits beschriebene Morphologie der MDCK<sub>TTL-GFP</sub>-Zellen und die Auswirkungen der Überexpression bestätigt werden (Zink et al., 2012). Ergänzend dazu diente die CRISPR/Cas9-induzierte *Knockout*-Zelllinie für weitere Untersuchungen, um die bereits gewonnenen Erkenntnisse und Beobachtungen zu stützen. Anhand der durchgeführten Experimente kann geschlussfolgert werden, dass eine gesteigerte Menge an detyrosiniertem Tubulin zu sehr flachen und ausgedehnten Zellen zu Beginn der Polarisierung führt und eine beschleunigte Entstehung einer intakten Zellmonoschicht bedingt. Allgemein zusammengefasst erfordert der einwandfrei funktionierende Verlauf des Polarisierungsprozesses einen Wechsel der verschiedenen Tubulin-Modifikationen. Dieses Resultat wird durch Untersuchungsergebnisse anderer Arbeiten bekräftigt (Quinones et al., 2011; Zink et al., 2012).

### 3.1.2. Untersuchung der Mikrotubuli-Dynamik

Die direkte Regulation der MT-Stabilität durch posttranslationale Modifikationen der Tubulin-Untereinheiten konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden (Thompson, 1977; Gundersen et al., 1984). Allerdings bestimmen die Tubulin-Modifikationen die Dynamik sowie die Stabilität von Mikrotubuli, indem sie die Bindung verschiedener MAPs und Proteinkomplexe regulieren. Mikrotubuli, die angereichert mit tyrosinierten  $\alpha$ -Tubulin-Untereinheiten sind, weisen ein dynamisches Verhalten auf, wohingegen Mikrotubuli, die eine Vielzahl an detyrosinierten  $\alpha$ -Tubulin-Untereinheiten enthalten, stabiler und langlebiger sind (Gundersen et al., 1984; Gundersen & Bulinski, 1986; Geuens et al., 1986; Kreis et al., 1987; Wehland & Weber, 1987). Da der *TTL-Knockout* eine Akkumulation von detyr-Tubulin, eine Reduktion von tyr-Tubulin und überdies hinaus eine Anreicherung an acetyliertem Tubulin bewirkte (Abb. 3.1. A und B) sollte als nächstes die Mikrotubuli-Dynamik in MDCK- und MDCK <sub>$\Delta$ TTL</sub>-Zellen analysiert werden. Dadurch können Informationen über die Stabilität der Mikrotubuli gewonnen werden, um die möglichen funktionellen Eigenschaften der Mikrotubuli interpretieren zu können.

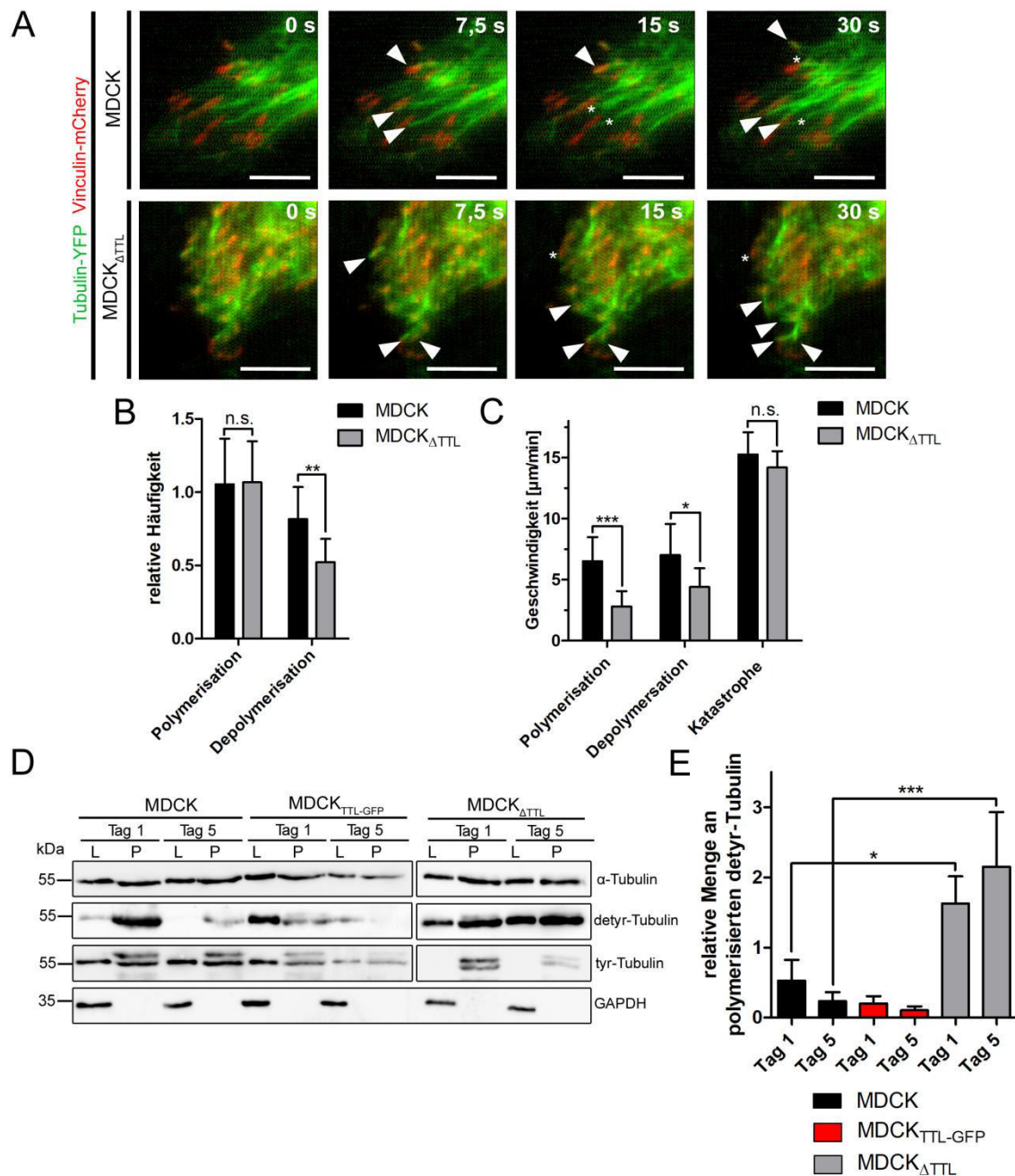
Zur Untersuchung wurden die Zellen transient mit Tubulin-YFP und Vinculin-mCherry, für eine bessere Visualisierung der MT-Dynamik, transfiziert. Dies ermöglichte die Darstellung des Mikrotubuli-Netzwerkes in lebenden Zellen mittels TIRF-Mikroskopie und die Untersuchung, ob sich die Mikrotubuli der beiden Zelllinien in ihrer Dynamik unterscheiden. Sowohl in MDCK-Zellen als auch in MDCK <sub>$\Delta$ TTL</sub>-Zellen konnten wachsende, schrumpfende aber auch pausierende Mikrotubuli beobachtet werden (Abb. 3.3. A). Auffällig war, dass die Mikrotubuli der MDCK <sub>$\Delta$ TTL</sub>-Zellen, trotz der erhöhten Menge an detyr-Tubulin, ein dynamisches Verhalten zeigten. Dies äußerte sich aber vor allem in der Wölbung, dem sogenannten *buckling*, einzelner Mikrotubuli-Filamente. Diese gewölbten Mikrotubuli sind typisch für stabile Mikrotubuli (Schulze et al., 1987) und

konnten auch in den MDCK-Zellen, jedoch nicht in den MDCK<sub>TTL-GFP</sub>-Zellen beobachten werden (s. Abb. 6.1.). Im Zuge der Charakterisierung der Mikrotubuli-Dynamik sollten die Polymerisations- und Depolymerisationsrate in MDCK- und MDCK<sub>ΔTTL</sub>-Zellen quantifiziert werden (Abb. 3.3. B). Für die Ermittlung der Polymerisationshäufigkeit wurden alle eindeutigen Wachstumsereignisse, die in einem Zeitraum von einer Minute auftraten, gewertet. Für die Ermittlung der Depolymerisationsrate wurden alle Ereignisse, in denen Mikrotubuli schrumpften oder sogar an ihrem wachsenden Ende rapide zerfielen (Katastrophe), gezählt. Die Quantifizierung machte deutlich, dass in den TTL-*Knockout*-Zellen signifikant weniger Depolymerisations-Ereignisse im Vergleich zu den Mikrotubuli der MDCK-Zellen über den gleichen Zeitraum auftraten. Im Gegensatz dazu war die Häufigkeit der Polymerisations-Ereignisse in beiden Zelllinien gleich.

Des Weiteren wurde die durchschnittliche MT-Polymerisations- und MT-Depolymerisationsgeschwindigkeit in den MDCK- und MDCK<sub>ΔTTL</sub>-Zellen ermittelt, indem die Länge einzelner Mikrotubuli in der Wachstums- bzw. Schrumpfphase über einen gewissen Zeitraum gemessen wurde. Außerdem wurde die Geschwindigkeit des Zerfalls einzelner Mikrotubuli-Stränge in beiden Zelllinien gemessen (Abb. 3.3. C). In den MDCK-Zellen wurde eine durchschnittliche Polymerisationsgeschwindigkeit von 6,51  $\mu\text{m}/\text{min}$  ( $\pm 1,9$ ) gemessen. Die Mikrotubuli der MDCK<sub>ΔTTL</sub>-Zellen wiesen im Vergleich dazu eine deutlich geringere Mikrotubuli-Polymerisationsgeschwindigkeit auf. Für die Mikrotubuli der TTL-*Knockout*-Zelllinie wurde eine Geschwindigkeit von 2,8  $\mu\text{m}/\text{min}$  ( $\pm 1,2$ ) gemessen. Folglich bewirkt die Detyrosinierung der Mikrotubuli eine signifikante Reduzierung der MT-Wachstumsgeschwindigkeit. Auch die Messung der Depolymerisations-geschwindigkeit zeigte einen signifikanten Unterschied in den beiden Zelllinien. Dabei konnte eine Geschwindigkeit von 7,01  $\mu\text{m}/\text{min}$  ( $\pm 2,4$ ) in den MDCK-Zellen ermittelt werden. Dahingegen depolymerisieren die Mikrotubuli in den MDCK<sub>ΔTTL</sub>-Zellen mit einer Geschwindigkeit von nur 4,39  $\mu\text{m}/\text{min}$  ( $\pm 1,5$ ). Die Dauer eines Katastrophe-Ereignisses war in beiden Zelllinien deutlich höher als die der Mikrotubuli-Depolymerisierung, da es sich bei dem Zerfall der Mikrotubuli in die dimeren Untereinheiten um ein schnelles, spontanes Ereignis handelt. Hierbei war allerdings kein Unterschied zwischen MDCK- und MDCK<sub>ΔTTL</sub>-Zellen zu erkennen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Detyrosinierung in den MDCK<sub>ΔTTL</sub>-Zellen zu einer Reduzierung des Mikrotubuli-Abbaus führt und diese weniger dynamisch sind.

Im nächsten Schritt wurde die Zusammensetzung der Mikrotubuli in unpolaren und polaren MDCK, MDCK<sub>ΔTTL</sub>- und MDCK<sub>TTL-GFP</sub>-Zellen analysiert, indem die Menge an eingebautem detyr-Tubulin sowie tyr-Tubulin in die Mikrotubuli bestimmt wurde. Dazu wurden zunächst die polymerisierten Tubulin-Filamente von den löslichen Tubulin-Dimeren getrennt und die einzelnen Fraktionen im Western Blot untersucht (Abb. 3.3. D).

Das im Zytosol vorkommende GAPDH diene als Kontrolle, um lösliches Material von der polymerisierten Fraktion zu unterscheiden. Wie die Quantifizierung der Tubulin-Mengen in Abb. 3.3. E zeigt kam es in den MDCK-Zellen im Zuge der Polarisierung zu einem Abfall an detyr-Tubulin, das stabil in die Mikrotubuli eingebaut war. Somit konnte eine deutliche Übereinstimmung mit der Literatur festgestellt werden, dass der Gehalt an detyrosiniertem Tubulin während der Polarisierung deutlich sinkt (Quinones et al., 2011; Zink et al., 2012).



**Abb. 3.3. Mikrotubuli-Dynamik und Zusammensetzung von Mikrotubuli**  
Abbildungsbeschriftung siehe nächste Seite.

**Abb. 3.3. Mikrotubuli-Dynamik und Zusammensetzung von Mikrotubuli**

(A) Unpolare MDCK- und MDCK<sub>ΔTTL</sub>-Zellen wurden mit Tubulin-YFP und Vinculin-mCherry (zur besseren Visualisierung) transfiziert und im TIRF-Mikroskop bei 90 nm Eindringtiefe betrachtet. Phasen der Polymerisation sind mit einem Pfeilkopf markiert, währenddessen sind Phasen der Depolymerisation mit einem Stern markiert. Maßstab: 5 µm. (B) Quantifizierung der relativen Häufigkeit von Polymerisations- (Rettung) und Depolymerisations-Ereignissen (Katastrophe) in MDCK-Zellen (n=2, 78 Mikrotubuli) und MDCK<sub>ΔTTL</sub>-Zellen (n=2 Zellen, 87 Mikrotubuli). Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test. (C) Messung der Geschwindigkeit der Polymerisation, der Depolymerisation sowie der Katastrophe-Ereignisse einzelner Mikrotubuli in MDCK-Zellen (n=4 Zellen, 14 Mikrotubuli) und MDCK<sub>ΔTTL</sub>-Zellen (n=4 Zellen, 14 Mikrotubuli). Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test. (D) Verhältnis zwischen löslichen und polymerisierten Tubulin in unpolaren (Tag 1) und polaren (Tag 5) MDCK, MDCK<sub>ΔTTL</sub>- und MDCK<sub>TTL-GFP</sub>-Zellen. Nachgewiesen wurden α-Tubulin, detyr-Tubulin und tyr-Tubulin. GAPDH diente als Kontrolle für Verunreinigungen in der polymerisierten Fraktion. Für die polymerisierte Fraktion wurde die 7,5-fache Menge aufgetragen. Die Signale der MDCK<sub>ΔTTL</sub>-Zellen wurden wegen starker Intensitäten separat detektiert. L=lösliche Fraktion, P=polymerisierte Fraktion. (E) Quantifizierung der Menge an detyr-Tubulin normalisiert gegen GAPDH aus Experimenten wie in D. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test.

Andererseits bestehen die Mikrotubuli sowohl unpolarer als auch polarer MDCK<sub>ΔTTL</sub>-Zellen aus signifikant mehr detyr-Tubulin im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien. Diese Zellen enthielten auch große Mengen an löslichem detyr-Tubulin, welches vermutlich aufgrund des Fehlens der TTL nicht mehr tyrosiniert und in Mikrotubuli eingebaut werden konnte. Außerdem war in der TTL-Knockout-Zelllinie nahezu das gesamte tyr-Tubulin in die polymerisierten Mikrotubuli-Stränge eingebaut. Die MDCK<sub>TTL-GFP</sub>-Zellen besaßen im Gegensatz dazu nur geringe Mengen an detyr-Tubulin sowie tyr-Tubulin, die in polymerisierten Mikrotubuli vorzufinden waren (Abb. 3.3. E).

Abschließend ist festzuhalten, dass die Deletion der TTL-Expression die Entstehung von weniger dynamischen Mikrotubuli bewirkt. Diese Mikrotubuli zeigten eine geringere Wachstumsgeschwindigkeit und weniger Depolymerisations-Ereignisse traten auf. Auch die Zusammensetzung der polymerisierten Mikrotubuli ändert sich nach Modulation der TTL-Expression deutlich. Dies lässt darauf schließen, dass das Mikrotubuli-Zytoskelett in den drei verwendeten Zelllinien unterschiedliche Eigenschaften besitzt.

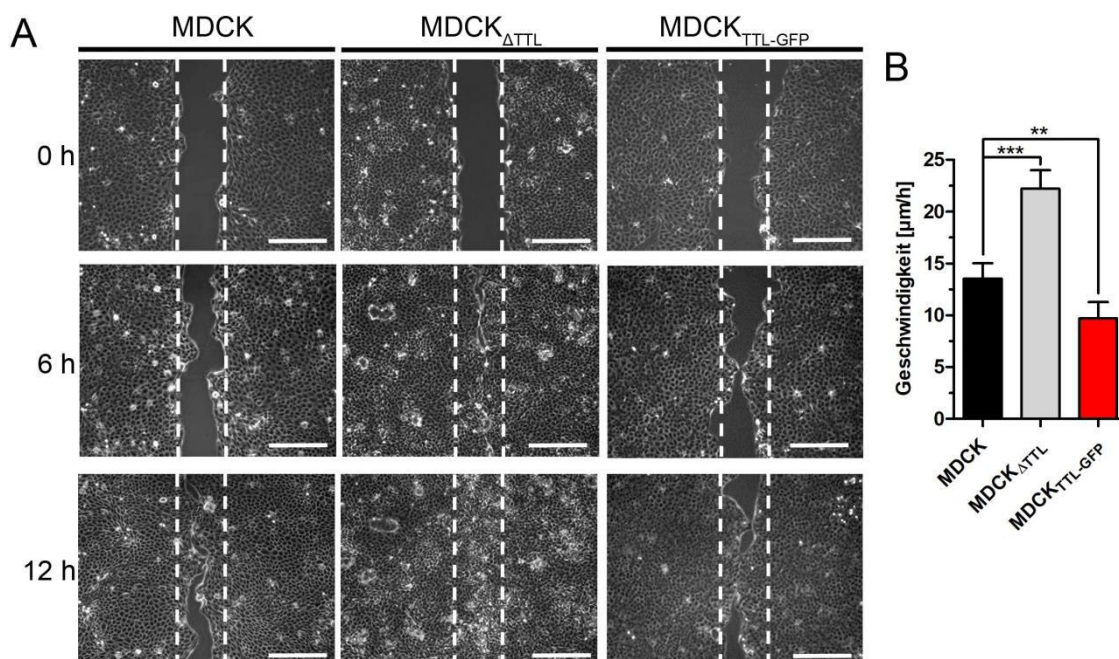
### 3.1.3. Die Auswirkung der Detyrosinierung auf das Migrationsverhalten und die zelluläre Adhäsion

Das Mikrotubuli-Zytoskelett ist für die Zellmigration von äußerst wichtiger Bedeutung. Mikrotubuli ermöglichen es der Zelle sowohl zusammenziehende als auch schiebende Kräfte zu generieren, um die äußere Form zu verändern und migrieren zu können. Dabei wird es von zahlreichen Proteinen reguliert und beeinflusst. Ein Mechanismus, um die Eigenschaften von Mikrotubuli bei diesem Prozess zu verändern und an die jeweiligen Bedingungen anzupassen, sind posttranslationale Modifikationen. Zu verstehen, wie diese Modifikationen den Prozess der Migration beeinflussen, ist von großem Interesse. Dennoch ist die spezifische Funktion der Tubulin-Modifikationen bei der Migration noch nicht genau aufgeklärt. Für die α-Tubulin Acetyltransferase αTAT1-vermittelte



Acetylierung konnte bereits gezeigt werden, dass durch diese Modifikation die Zellmigration von Astrozyten begünstigt wird (Bance et al., 2019).

Daher sollte im nächsten Schritt untersucht werden, wie sich die Manipulation der TTL-Expression auf die gerichtete Migration von MDCK-Zellen auswirkt. Die Migration von Zellen kann durch einen Wundheilungs-Test induziert werden, um diese anschließend quantitativ auszuwerten. Für diese Versuchsreihe wurden MDCK-, MDCK $\Delta$ TTL- und MDCK $\Delta$ TTL-GFP-Zellen verwendet und miteinander verglichen. Nach der mechanischen Verletzung des Zellmonolayers wurde die Zellwanderung in das verletzte Areal über einen Zeitraum von 12 h aufgenommen (Abb. 3.4. A). Das Wundareal wurde dabei alle 15 min gemessen und basierend darauf die Migrationsgeschwindigkeit der einzelnen Zelllinien berechnet (Abb. 3.4. B). Bereits 6 h nach Zufügen der Wunde konnte ein deutlicher Unterschied in der Rissfläche der drei Zelllinien beobachtet werden. Im Vergleich zu den MDCK- und MDCK $\Delta$ TTL-GFP-Zellen sind zu diesem Zeitpunkt bereits mehr MDCK $\Delta$ TTL-Zellen in das Wundareal eingewandert. Über den gesamten Beobachtungszeitraum konnte das komplette Schließen des Risses nur in den MDCK $\Delta$ TTL-Zellen beobachtet werden. Diese Unterschiede spiegeln sich in den berechneten Migrationsgeschwindigkeiten wieder. Die TTL-Knockout-Zellen migrierten signifikant schneller als die anderen beiden Zelllinien. Die MDCK $\Delta$ TTL-GFP-Zellen zeigten die geringste Migrationsgeschwindigkeit.



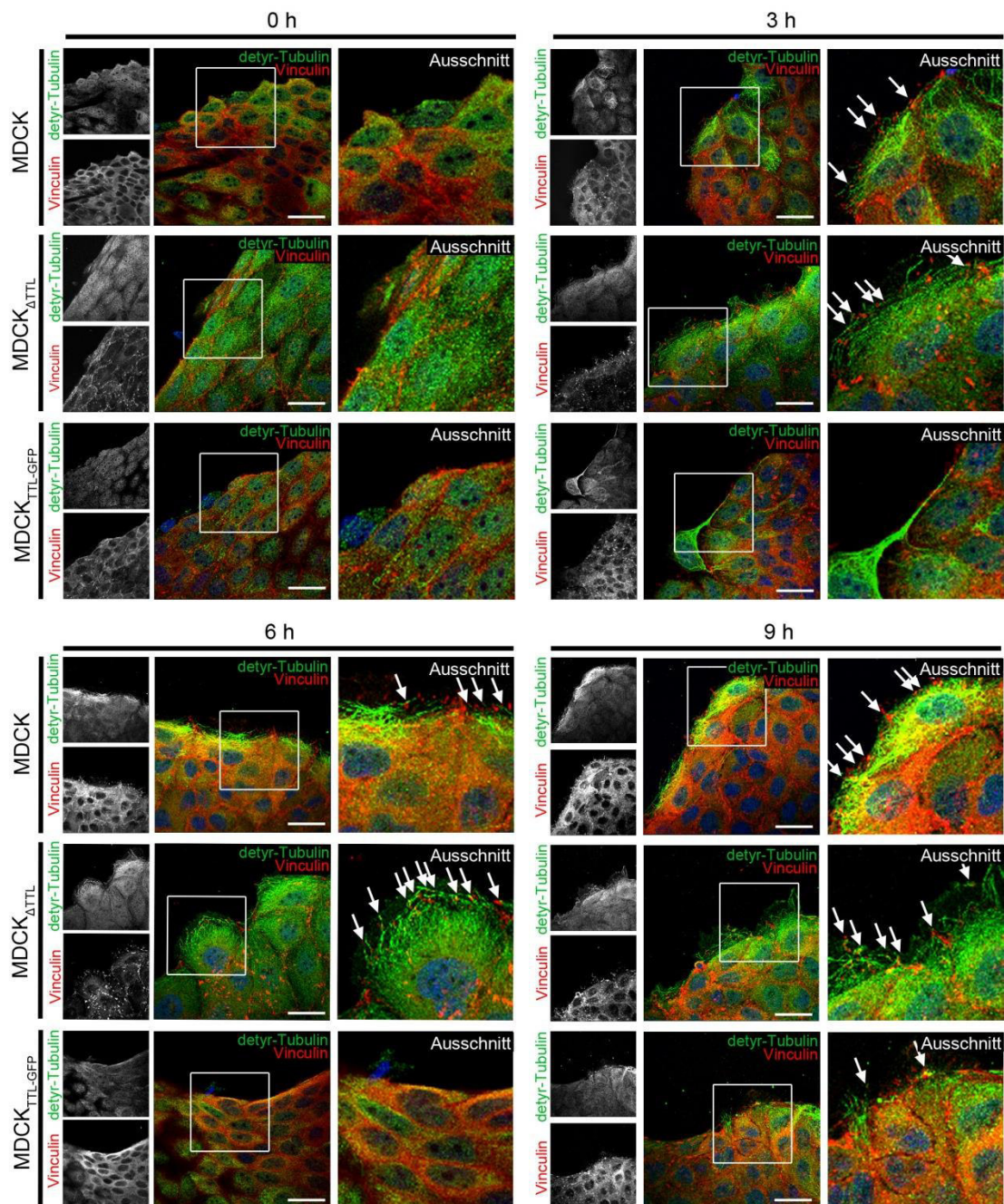
**Abb. 3.4. Einfluss der Tubulin-Detyrosinierung auf die Zellmigration**

(A) MDCK-, MDCK $\Delta$ TTL- und MDCK $\Delta$ TTL-GFP-Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 90% kultiviert. Nach der mechanischen Verletzung des Zellmonolayer folgten anschließend Aufnahmen der Zellwanderung in das verletzte Areal über einen Zeitraum von 12 h. Die gestrichelten, weißen Linien markieren den Riss. Maßstab: 100 μm. (B) Durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit der MDCK-, MDCK $\Delta$ TTL- und MDCK $\Delta$ TTL-GFP-Zellen. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test, n=6; n=3 für MDCK $\Delta$ TTL-Zellen. In Zusammenarbeit mit Manuel Müller

Neben den mechanischen Kräften, welche das Mikrotubuli-Zytoskelett während der Zellmigration bereitstellt, sind Mikrotubuli für die Regulation der Dynamik fokaler Kontakte entscheidend. Der regulierte Aufbau sowie Abbau dieser Strukturen ist essentiell für migratorische Prozesse. Durch die Interaktion der Fokalkontakte mit Aktin-Strukturen werden Zugkräfte generiert, die dann auf die extrazelluläre Matrix übertragen werden. Dies bewirkt die Vorwärtsbewegung der Zellen. Mikrotubuli sind in migrierenden Zellen häufig mit den fokalen Adhäsionen assoziiert (Rinnerthaler et al., 1988). Denn Mikrotubuli-Filamente sind wichtig für den Vesikeltransport von und zu den Adhäsionsstrukturen und sie sorgen für die Bereitstellung von Integrinen am vorderen Teil der Zelle (Bretscher & Aguado-Velasco, 1998; Gu et al., 2011; Etienne-Manneville, 2013). Mikrotubuli können auch die Auflösung der fokalen Adhäsionen induzieren (Kaverina et al., 1998, 1999). In der Literatur gibt es allerdings nur wenige Arbeiten, die den Einfluss von Tubulin-Modifikationen auf die Dynamik von Fokalkontakten analysiert haben.

Um nun den Einfluss und die Auswirkungen der Detyrosinierung auf die fokalen Adhäsionen zu untersuchen, wurden MDCK-, MDCK<sub>ΔTTL</sub>- und MDCK<sub>TTL-GFP</sub>-Zellen während des Migrationsprozesses detaillierter betrachtet. Dazu wurden die migrierenden Zellen während des Wundheilungs-Tests nach verschiedenen Zeitwerten fixiert. Mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen konnte die Verteilung und Lokalisation Vinculin-positiver Fokalkontakte untersucht werden. Außerdem wurden auf diese Weise detyrosinierte Mikrotubuli spezifisch detektiert, damit deren Anordnung sowie die Assoziation mit den fokalen Adhäsionen genauer betrachtet werden konnten (Abb. 3.5.). Bereits 6 h nach Zufügen des Risses haben sich die MDCK-Zellen auf der Wachstumsfläche ausgebreitet und bildeten Lamellipodien aus. Diese wiesen eine große Anzahl an Vinculin-positiven Fokalkontakten auf. In dieser Zelllinie war es wenigen Mikrotubuli, die angereichert an detyr-Tubulin waren, möglich, in das Lamellipodium einzudringen. Diese Pionier-Mikrotubuli wurden in der Literatur bereits beschrieben (Etienne-Manneville, 2013). Bei den MDCK<sub>ΔTTL</sub>-Zellen scheint die gerichtete Bewegung der Zellen schneller in Gang gesetzt zu werden, da sie bereits nach wenigen Stunden deutlich ausgeprägte Lamellipodien mit zahlreichen detyrosinierten Mikrotubuli, die in Migrationsrichtung zeigten, aufwiesen. Ein Großteil dieser Mikrotubuli assoziierte mit den Vinculin-positiven fokalen Anheftungsstellen, wo sie vermutlich das Wachstum der Kontakte durch den gezielten Transport von Integrinen bewirken. Auch in dieser Zelllinie konnte eine Vielzahl an Pionier-Mikrotubuli detektiert werden. Außerdem war in den MDCK- und MDCK<sub>ΔTTL</sub>-Zellen eine polare Verteilung der mit detyrosinierten Tubulin-Untereinheiten angereicherten Mikrotubuli während der Migration deutlich erkennbar, wodurch die typische asymmetrische Zellpolarisierung hervorgerufen wurde.





**Abb. 3.5. Untersuchung der Verteilung von detyr-Tubulin und Fokaladhäsionen während des Wundheilungs-Tests**

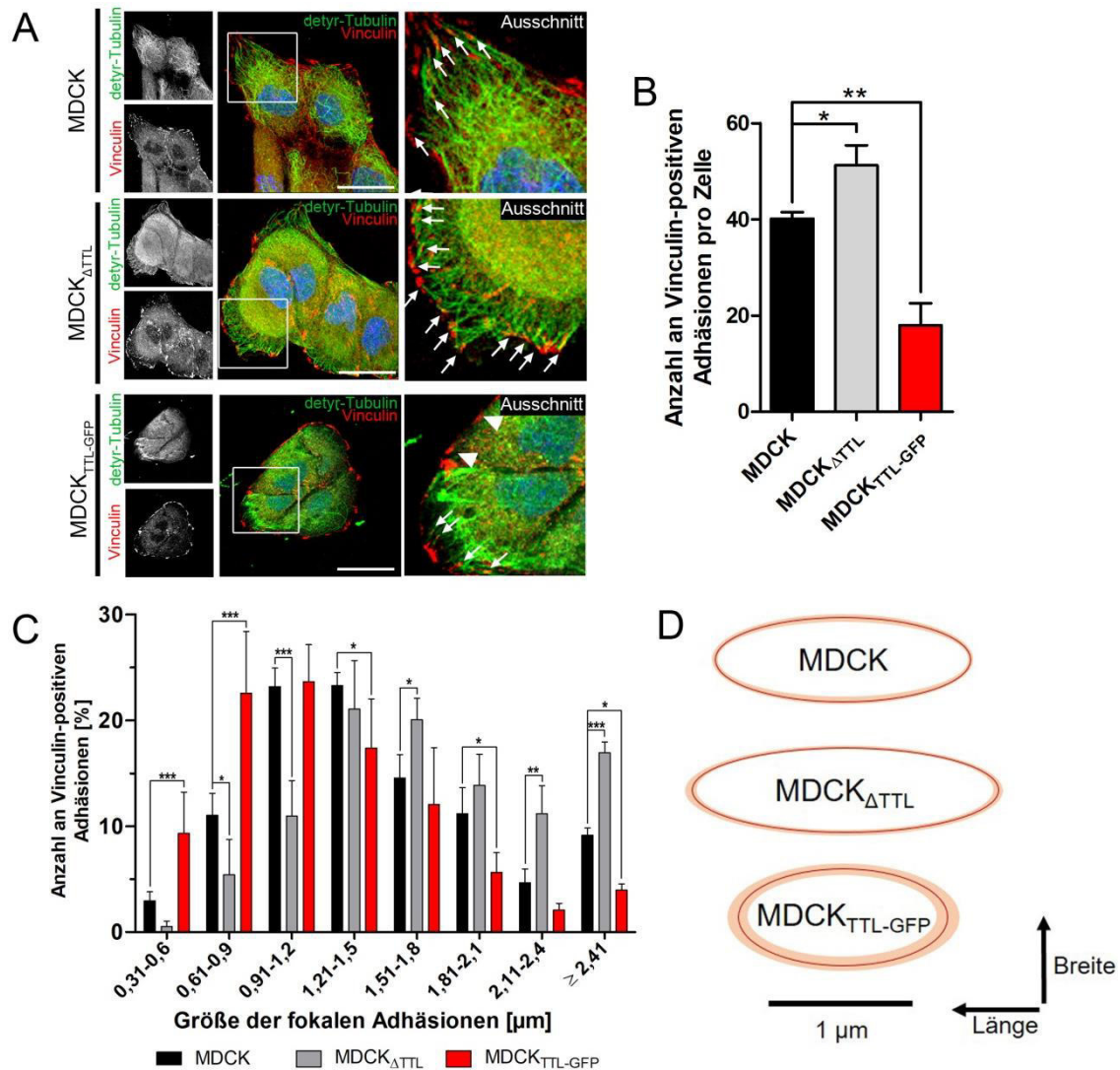
Durch mechanische Verletzung der Zellmonoschicht wurden die Wundheilung und das Migrieren der Zellen in das verletzte Areal ausgelöst. Die Zellen wurden nach den angegebenen Zeitwerten fixiert und anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit detyr-Tubulin (Alexa Fluor 546) und Vinculin (Alexa Fluor 488) durchgeführt. Die Pfeile markieren Vinculin-positive fokale Strukturen, die mit detyr-Tubulin assoziiert sind. Dargestellt sind repräsentative konfokalmikroskopische Bilder von MDCK-, MDCK $\Delta$ TTL- und MDCK $\Delta$ TTL-GFP-Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten, n=3. Maßstab: 25  $\mu$ m. *In Zusammenarbeit mit Manuel Müller*

Dies verdeutlicht, dass in beiden Zelllinien die Mikrotubuli in der Lage sind, schnell auf extrazelluläre Signale zu reagieren und sich rasch an die umliegenden Bedingungen anzupassen. Diese Beobachtung wird durch Studien untermauert, die zu Beginn des Migrationsprozesses eine selektive Stabilisierung von Mikrotubuli, welche in Migrationsrichtung ausgerichtet sind, beschreiben konnten (Gundersen & Bulinski,

1988). Selbiges wurde auch für acetylierte Mikrotubuli festgehalten (Bance et al., 2019). Währenddessen zeigten die TTL-überexprimierenden MDCK-Zellen zu allen Zeitpunkt noch eine klare Grenzfläche zum Wundareal. Über den gesamten Zeitverlauf bildeten die MDCK<sub>TTL-GFP</sub>-Zellen kaum Lamellipodien aus. Diese enthielten zwar einige fokale Strukturen, allerdings konnten scheinbar keine detyrosinierten Mikrotubuli in die Zellausläufer vordringen. Interessanterweise konnten teilweise sehr bewegliche MDCK<sub>TTL-GFP</sub>-Zellen beobachtet werden, die eine ungewöhnliche Anreicherung an detyrosinierten Tubulin zeigten.

Anhand der durchgeführten Untersuchung lässt sich feststellen, dass die Detyrosinierung einen eindeutigen Einfluss auf die zelluläre Organisation während der Zellmigration ausübt. Die veränderte TTL-Expression in den MDCK<sub>ΔTTL</sub>-Zellen bzw. MDCK<sub>TTL-GFP</sub>-Zellen beeinflusste das Migrationsverhalten der Zellen unterschiedlich. Des Weiteren muss festgehalten werden, dass unterschiedliche Auswirkungen sowohl auf die Ausbildung des Lamellipodiums wie auch auf die Organisation der fokalen Adhäsionen in den untersuchten Zelllinien auftraten. Aufgrund dieser gewonnen Erkenntnisse stellte sich die Frage, welchen genauen Einfluss die Detyrosinierung auf die Fokalkontakte hat. Dadurch kann die mögliche Funktionsweise der detyrosinierten Mikrotubuli auf die Zelladhäsion aufgeklärt werden. Um der Fragestellung nachzugehen, sollten Fokaladhäsionen detaillierter charakterisiert werden. Dafür wurden als Nächstes sowohl die Verteilung als auch die Anzahl und Größe von Vinculin- und Paxillin-positiven Fokaladhäsionen in unpolaren MDCK-, MDCK<sub>ΔTTL</sub>- und MDCK<sub>TTL-GFP</sub>-Zellen bestimmt. Die KLSM-Aufnahmen der MDCK-Zellen zeigten viele, deutliche Fokalkontaktpunkte, die positiv für Vinculin waren (Abb. 3.6. A). Diese Kontaktstellen lokalisierten hauptsächlich im Bereich des Lamellipodiums und am äußersten Rand der Zellen. Auch bei dieser Analyse war die polare Anordnung der detyrosinierten Mikrotubuli, deren Enden in der räumlichen Nähe von Vinculin-positiven Fokalkontakten waren, in Richtung Zellfront zu erkennen. In MDCK<sub>ΔTTL</sub>-Zellen war eine ähnliche Verteilung zu erkennen. Diese Zellen bildeten zahlreiche fokale Adhäsionsstellen aus, die sich hauptsächlich an den Enden von stabilen Mikrotubuli befanden. Bei den MDCK<sub>TTL-GFP</sub>-Zellen ließen sich im Gegensatz dazu nur vereinzelt kleine, punktförmige fokale Adhäsionsstellen beobachten. Außerdem waren größere akkumulierte Komplexe in der Zellperipherie aufzufinden, die hohe Konzentrationen an Vinculin enthielten. Anhand der aufgenommenen Fluoreszenzbilder wurde im nächsten Schritt die Anzahl der Vinculin-positiven Fokalkontakte bestimmt (Abb. 3.6. B). Signifikant mehr Adhäsionsstellen konnten hierbei in den MDCK<sub>ΔTTL</sub>-Zellen im Vergleich zu den MDCK-Zellen gezählt werden. Die MDCK<sub>TTL-GFP</sub>-Zellen enthielten die wenigsten fokalen Adhäsionsstrukturen. Außerdem waren die fokalen Adhäsionen in den drei Zelllinien unterschiedlich groß (Abb. 3.6. C). Vor allem die Deletion der TTL bewirkte

eine signifikante Vergrößerung der Fokalkontakte. Die Größenverteilung in Abb. 3.6. C macht deutlich, dass die MDCK $_{\Delta TLL}$ -Zellen nur sehr wenig kleine fokale Adhäsionen enthielten. Dafür wiesen sie signifikant mehr große Fokalkontakte im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien auf. Ebenfalls wird deutlich, dass in den MDCK $_{TLL-GFP}$ -Zellen hauptsächlich kleine fokale Strukturen vorzufinden waren.



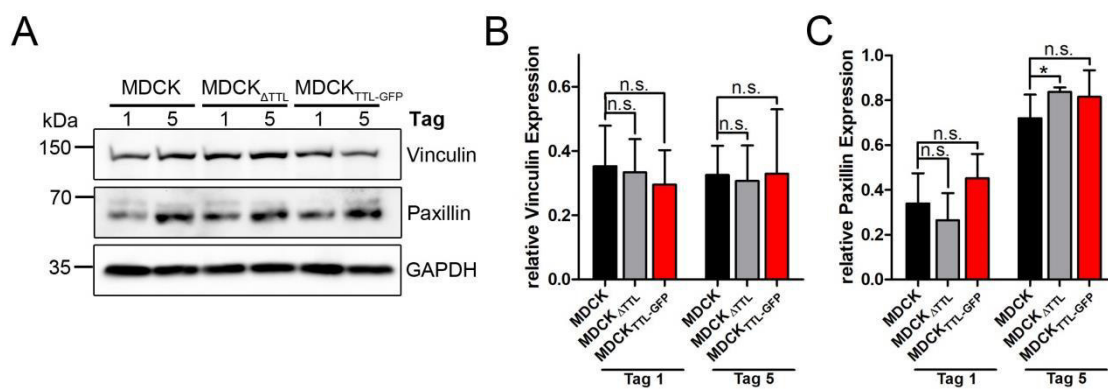
**Abb. 3.6. Zusammenhang zwischen der Tubulin-Detyrosinierung und der Anzahl und Größe Vinculin-positiver fokaler Adhäsionen**

(A) Unpolare MDCK-, MDCK $_{\Delta TLL}$ - und MDCK $_{TLL-GFP}$ -Zellen wurden fixiert und gegen Vinculin (Alexa Fluor 546) zusammen mit detyr-Tubulin (Alexa Fluor 647) immungefärbt. Die Pfeile markieren Vinculin-positive fokale Strukturen, die mit detyr-Tubulin assoziiert sind. Diese Fokalkontakte sind in Richtung der Migration orientiert. Die Pfeilspitzen markieren Vinculin-positive fokale Adhäsionen, die am Rand der isolierten Inseln bestehend aus MDCK $_{TLL-GFP}$ -Zellen angeordnet sind. Maßstab: 25  $\mu m$ . (B) Quantifizierung der Vinculin-positiven Fokaladhäsionen pro Zelle. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test, (MDCK-Zellen: n=504 fokale Adhäsionen; MDCK $_{\Delta TLL}$ -Zellen: n=528 fokale Adhäsionen; MDCK $_{TLL-GFP}$ -Zellen: n=511 fokale Adhäsionen), n=3. (C) Größenverteilung der Vinculin-positiven fokalen Adhäsionen. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einer zweifaktoriellen ANOVA und Bonferroni-Post-Test, n=3. (D) Schematische Darstellung der Form und durchschnittlichen Größe (rote Linie) von Vinculin-positiven Adhäsionen in MDCK-, MDCK $_{\Delta TLL}$ - und MDCK $_{TLL-GFP}$ -Zellen. SD ist in orange dargestellt. Maßstab: 1  $\mu m$ .



Betrachtet man die Morphologie der Strukturen, so wird deutlich, dass Adhäsionen der TTL-Knockout-Zelllinie eine elongierte Form aufwiesen, wohingegen die fokalen Adhäsionen der MDCK<sub>TTL-GFP</sub>-Zellen rundlicher waren. Ähnliche Beobachtungen konnten für Paxillin-positive fokale Adhäsionen gemacht werden (s. Abb. 6.2.).

Um auszuschließen, dass die Größenunterschiede der Fokaladhäsionen durch eine Änderung der Expression von bestimmten Adhäsionsproteinen bedingt waren, wurde die Proteinmenge von Vinculin und Paxillin in unpolaren und polaren MDCK-, MDCK<sub>ΔTTL</sub>- und MDCK<sub>TTL-GFP</sub>-Zellen mittels Western Blot analysiert (Abb. 3.7. A). Unabhängig von der Zellpolarität und Zelllinie konnte kein Unterschied weder in der Vinculin-Expression (Abb. 3.7. B) noch in der Paxillin-Expression (Abb. 3.7. C) festgestellt werden.



**Abb. 3.7. Expression von Vinculin in Abhängigkeit der TTL-Expression**

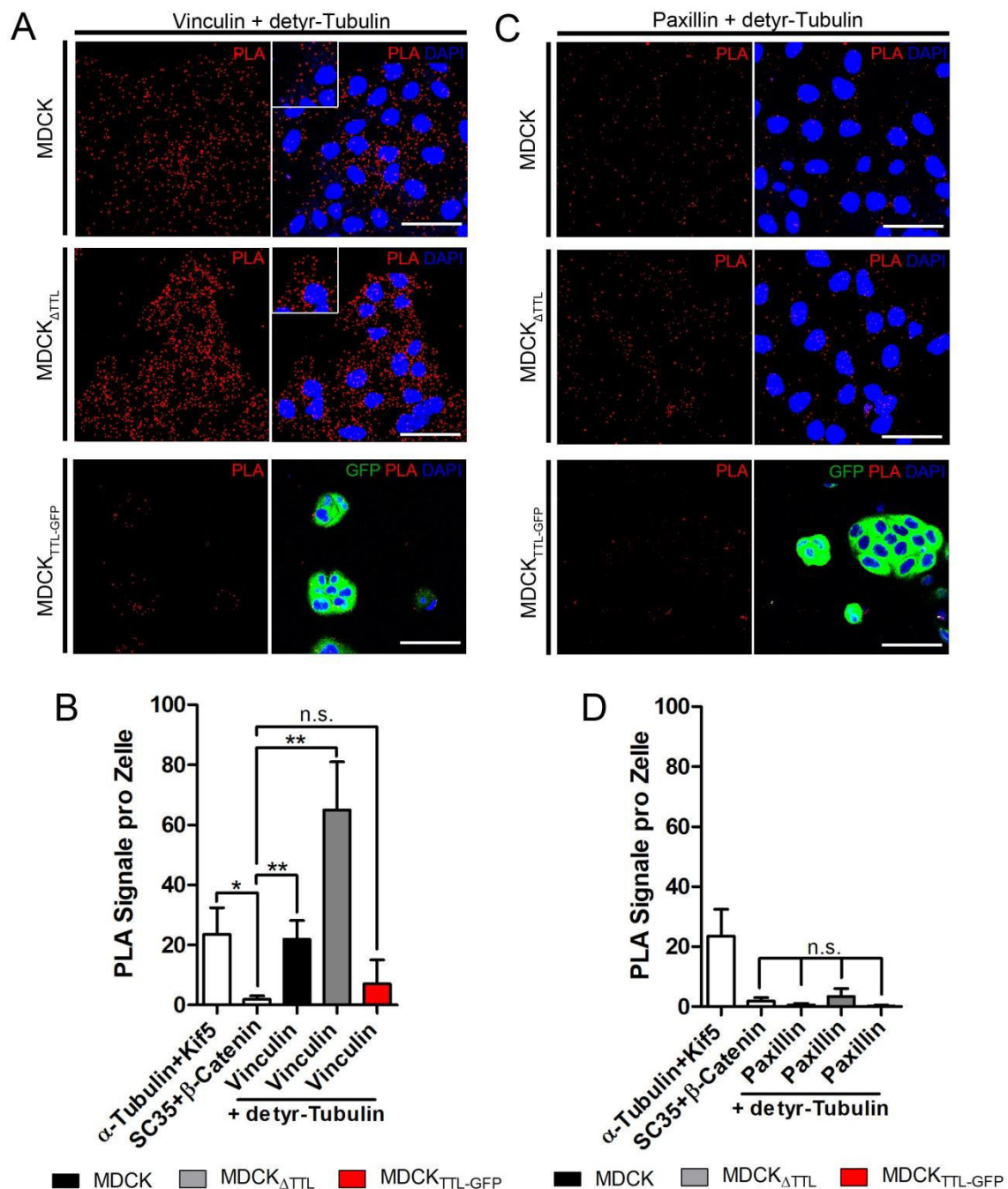
(A) Unpolare und polare MDCK-, MDCK<sub>ΔTTL</sub>- und MDCK<sub>TTL-GFP</sub>-Zellen wurden lysiert und im Western Blot wurde die Menge von Vinculin untersucht. GAPDH diente als Ladekontrolle. (B)-(C) Quantifizierung der Vinculin- (B) und Paxillin-Proteinmenge (C) im Lysat, normalisiert gegen GAPDH. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test, n=6 bzw. n=4. In Zusammenarbeit mit Manuel Müller

Zusammenfassend konnte durch diese Experimente gezeigt werden, dass Anzahl und Größe fokaler Adhäsionsstellen zwischen den drei Zelllinien variierten. Die Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Detyrosinierung möglicherweise die Dynamik fokaler Adhäsionen kontrolliert und eine wichtige Rolle bei diesem komplexen Prozess einnimmt.

### 3.1.4. Stabile, detyrosinierte Mikrotubuli befinden sich in räumlicher Nähe zu Vinculin

Die gerichtete Zellmigration setzt eine strikte Regulation der MT-Dynamik voraus. Dementsprechend befinden sich vor allem stabile, detyrosinierte Mikrotubuli im entstehenden Lamellum (Nagasaki et al., 1992). Außerdem treten Katastrophe-Ereignisse und die Depolymerisierung der Mikrotubuli hauptsächlich am Zellende auf. Diese Dynamik ist für den Abbau der fokalen Adhäsionen von großer Bedeutung, denn Mikrotubuli wachsen wiederholend in Richtung der Fokaladhäsionen und treten mit diesen in Kontakt, was den Abbau dieser Strukturen zur Folge hat

(Kaverina et al., 1998, 1999). Im Gegensatz dazu werden die Pionier-Mikrotubuli nicht depolymerisiert (Wadsworth, 1999; Waterman-Storer & Salmon, 1997).



**Abb. 3.8. Proximity Ligation Assay von detyr-Tubulin und Vinculin sowie Paxillin**

(A)+(C) Unpolare MDCK-, MDCK<sub>ΔTTL</sub>- und MDCK<sub>TTL-GFP</sub>-Zellen wurden einem *in situ* PLA unterzogen und im Anschluss im KLSM ausgewertet. Verwendet wurden Antikörper gegen Vinculin (A) und Paxillin (C) sowie detyr-Tubulin. Maßstab: 50  $\mu$ m. (B)+(D) Quantifizierung der identifizierten PLA-Signale pro Zelle für Vinculin (B) und Paxillin (D). Als Positivkontrolle dienten Antikörper gegen  $\alpha$ -Tubulin und Kif5, als Negativkontrolle wurden Antikörper gegen SC35 und  $\beta$ -Catenin. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test, n=3.

Die verringerte Dynamik der Mikrotubuli in den TTL-*Knockout*-Zellen wäre demnach eine mögliche Erklärung für die bereits beschriebene Vergrößerung und Anhäufung der fokalen Adhäsionen in dieser Zelllinie. Als Nächstes sollte daher geklärt werden, ob die stabilen Mikrotubuli, angereichert mit detyrosinierten Tubulin-Untereinheiten, tatsächlich vermehrt mit Vinculin bzw. Paxillin in Kontakt treten und sich in räumlicher Nähe zu den beiden Proteinen befinden.

Zur Untersuchung dieser Frage wurde ein *Proximity Ligation Assay* durchgeführt, der es ermöglicht, die physikalische Nähe zweier Proteine (unter 40 nm) visuell darzustellen. Da dieser Assay durch die entstehenden, punktförmigen Signale schwer zu überprüfen ist, wurden zusätzlich zu jedem Versuch eine Positivkontrolle, die aus dem bereits bestätigten Interaktionspaar  $\alpha$ -Tubulin und Kif5B bestand, sowie eine Negativkontrolle (SC35 und  $\beta$ -Catenin) mitgeführt. Der PLA zeigte, dass detyr-Tubulin und Vinculin tatsächlich in nächster Nähe zueinander vorliegen (Abb. 3.8. A). Ein Großteil der PLA-Signale befand sich in der Peripherie oder in den Ausläufern der Zellen. Allerdings konnten auch Signale über die gesamte Zelle beobachtet werden. Die Quantifizierung des PLA zeigt, dass gegenüber der Negativkontrolle signifikant mehr PLA-Signale in den MDCK $_{\Delta$ TTL-Zellen als in MDCK-Zellen gezählt wurden (Abb. 3.8. B). Im Vergleich dazu konnten nur sehr wenige bzw. kaum Signale in den MDCK $_{TTL-GFP}$ -Zellen detektiert werden. Erstaunlicherweise konnte in keiner der verwendeten Zelllinien eine räumliche Nähe von detyr-Tubulin und Paxillin nachgewiesen werden (Abb. 3.8. C und D).

Diese Studie macht deutlich, dass Vinculin, aber nicht Paxillin, bevorzugt mit stabilen Mikrotubuli assoziiert. Es konnte allerdings noch nicht geklärt werden, ob es sich bei der Assoziation zwischen detyr-Tubulin und Vinculin um eine direkte Interaktion, die allerdings aufgrund der Komplexität sehr unwahrscheinlich ist, handelt.

### 3.2. Die Rolle von Mx1 im intrazellulären Proteintransport

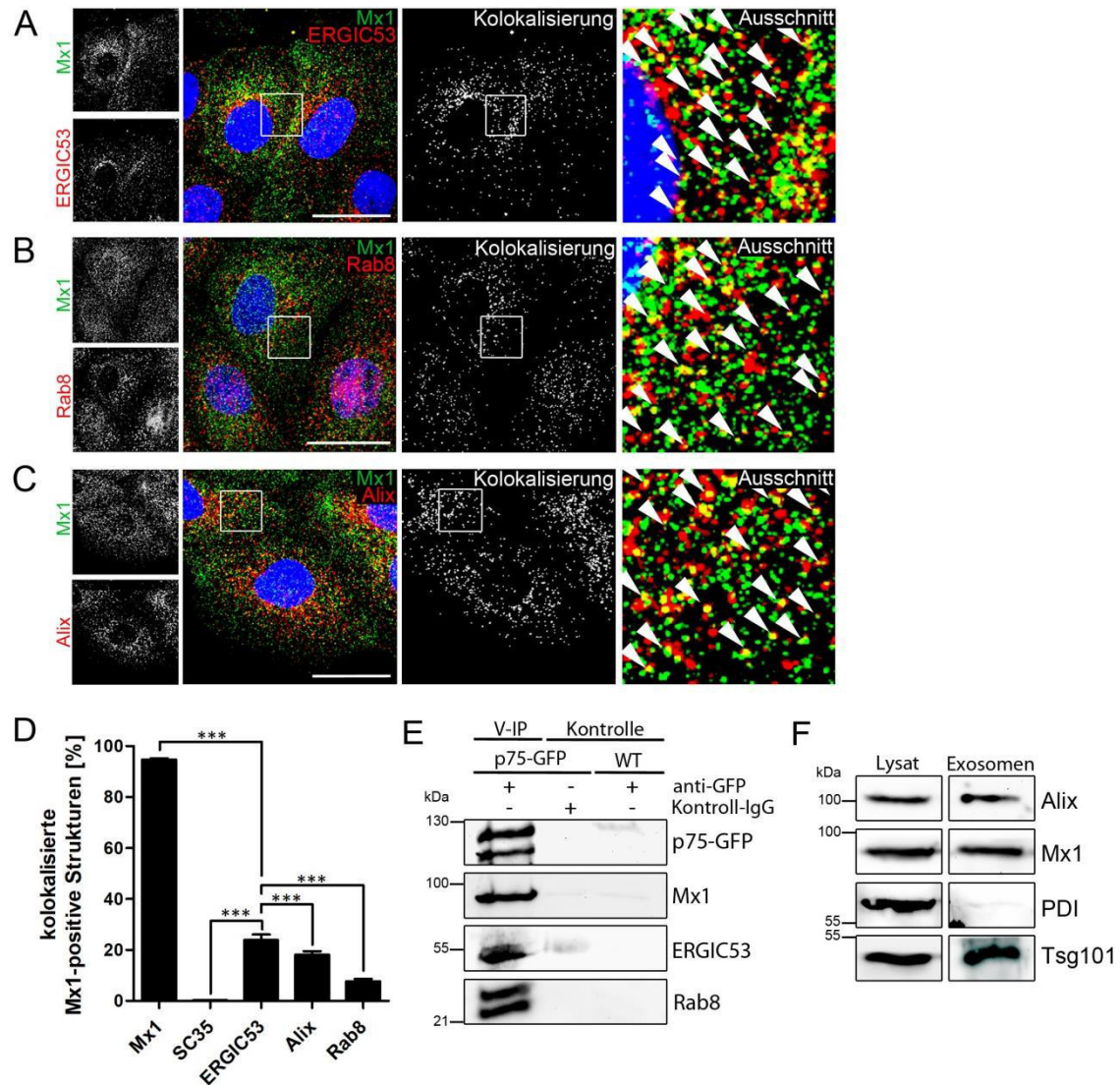
Mx1 ist als eine wichtige Komponente des intrazellulären Proteintransports identifiziert und beschrieben worden (Hoff et al., 2014). Die genaue funktionelle Rolle der großen GTPase in diesem Prozess ist bislang allerdings noch nicht genau erforscht. Die Aufklärung dieser Frage soll daher in den nachfolgenden Kapiteln dargestellt werden.

#### 3.2.1. Die subzelluläre Lokalisation von Mx1

Mx1 ist ein im Zytoplasma vorliegendes Protein (Nakamura et al., 2005), das in diesem komplexen Transportsystem seiner noch nicht genau verstandenen Funktion nachgeht. Canines Mx1 ist genau wie humanes MxA in nicht-infizierten Zellen (Haller et al., 2007a) mit vesikulären Strukturen assoziiert und zeigt eine punktförmige Verteilung innerhalb der Zelle. Eine Membranaufreinigung konnte deutlich zeigen, dass Mx1 in der Membranfraktion zu finden ist (Hoff et al., 2014).

Um die Lokalisation von Mx1 innerhalb dieses komplexen Systems und die Eigenschaften von Mx1-positiven Membranen weiter aufzuklären, wurde die subzelluläre Verteilung von Mx1 in MDCK-Zellen durch Immunfluoreszenzfärbungen und anschließender konfokalmikroskopischer Aufnahmen untersucht. Basierend auf den bereits beschriebenen Beobachtungen über die Lokalisation von Mx1 wurde daher zunächst die Kolo-kalisation von endogenem Mx1 mit dem hauptsächlich im ER-Golgi Intermediärkompartiment vorkommenden ERGIC53, mit dem endosomalen Protein Rab8 und dem exosomalen Markerprotein Alix analysiert. Für die Visualisierung von endogenem Mx1 wurde sowohl ein monoklonaler (mAb) als auch ein polyklonaler (pAb) Mx1-Antikörper verwendet. Gleichzeitig diente die Doppelfärbung mit diesen beiden Antikörpern als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurde ein Antikörper gegen den ausschließlich im Nukleus vorhandenen Spleißfaktor SC35 verwendet, da canines Mx1 ausschließlich im Zytoplasma vorliegt (Nakamura et al., 2005; Hoff et al., 2014). Als Kontrolle für eine unspezifische Bindung des verwendeten Zweitantikörpers bei jeder Färbung wurden zusätzlich Proben angefertigt, die nur mit dem entsprechenden Zweitantikörper inkubiert wurden. Mit diesen Proben wurde dann der Schwellenwert für die Aufnahmeeinstellungen festgelegt. Abb. 3.9. A-C zeigen das vesikuläre Erscheinungsmuster von Mx1 im Zytoplasma der Zellen. Die Doppelfärbung von Mx1-positiven Membranen mit den monoklonalen und polyklonalen Mx1-Antikörpern weist eine nahezu identische Kolo-kalisation der gefärbten Kompartimente auf. Die Spezifität der beiden Antikörper gegen ihr Epitop wurde vorab überprüft und beide verwendeten Antikörper detektieren bei der Immunfluoreszenzfärbung das gleiche Protein (Hoff, 2015). Die Färbungen mit den jeweiligen Markerproteinen zeigen eine eindeutige Kolo-kalisation von Mx1-positive Strukturen mit ERGIC53, Rab8 und Alix.

Dahingegen sind endogenes Mx1 und das im Zellkern lokalisierte SC35 nicht im gleichen subzellulären Kompartiment lokalisiert. Für die Quantifizierung der jeweiligen Mx1-Kolokalisierung mit dem entsprechenden Markerprotein wurden alle vesikulären Strukturen beider Kanäle bestimmt.



**Abb. 3.9. Mx1 assoziiert mit Membranen des ER und Endosomen**

(A)-(C) MDCK wurden für zwei Tage kultiviert, anschließend fixiert. Mx1 und die Markerproteine wurden mit mAb Mx1 (Alexa Fluor 488) oder pAb Mx1 (Alexa Fluor 488) mit entweder pAb ERGIC53 (Alexa Fluor 647) (A), mAb Rab8 (Alexa Fluor 647) (B) oder pAb Alix (Alexa Fluor 647) (C) mittels Immunfluoreszenz visualisiert. Zur Veranschaulichung wurden kolokalisierte Strukturen mithilfe eines eigenen Kanals dargestellt (weiß). Strukturen, die positiv für Mx1 und das entsprechende Markerprotein sind, sind in den Bildausschnitten mit Pfeilköpfen markiert. Zellkerne wurden mit Hoechst33342 (blau) gefärbt. Maßstab: 25 µm. (D) Quantifizierung der Kolokalisierung von Mx1-positiven Strukturen mit Mx1 (n=14 Zellen), SC35 (n=32 Zellen), ERGIC53 (n=36 Zellen), Alix (n=40 Zellen) und Rab8 (n=40 Zellen) dargestellt wie in (A)-(C). Kolokalisierte Strukturen wurden mit Hilfe des Manders Koeffizienten berechnet. Normalisiert wurde gegen die Summe aller Mx1-positiven Vesikel. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test, n=3. (E) p75-GFP-positive Membranen wurden 10 min nach einem TGN-Exit bei 37°C aus stabil transfizierten MDCK<sub>p75-GFP</sub>-Zellen immunpräzipitiert (V-IP) und mittels Immunoblot analysiert. Als Negativkontrolle dienten Präzipitate mit unspezifischen IgG-Antikörpern und MDCK-Zellen, n=3. (F) Western Blot Analyse des Lysats und der exosomal fraktioniert aus polaren MDCK-Zellen. Als Positivkontrolle der Exosomen dienten Tsg101 und Alix, PDI dagegen als Negativkontrolle. Mx1 konnte in der exosomal fraktion nachgewiesen werden, n=3. p75-GFP=MDCK<sub>p75-GFP</sub>-Zellen, WT=MDCK-Zellen, V-IP=Vesikel-Immunpräzipitation. Aus Ringer et al., 2018.



Als Kolokalisation wurden ausschließlich Strukturen gewertet, die einen Manders Koeffizienten von Mx und My  $\geq 0,5$  aufwiesen. Anschließend wurde der prozentuale Anteil dieser kolokalisierten Strukturen zu der Gesamtzahl an Mx1-positiven Strukturen errechnet. Die Quantifizierung der Daten (Abb. 3.9. D) bestätigt eine nahezu 100%-ige Kolokalisierung bei der Verwendung der beiden Mx1-Antikörper und nahezu keine (ca. 0,2%) Kolokalisation mit SC35. Bei der Untersuchung der Lokalisation von Mx1 in Bezug auf zelluläre Markerproteine, findet man die stärkste Kolokalisierung mit ERGIC53 (ca. 23%). Mx1 zeigt eine etwas geringere Assoziation mit Alix-positiven Strukturen (ca. 20%). Die geringste Kolokalisation war zwischen Mx1 mit Rab8 (ca. 9%) festzustellen. Im Vergleich zur Negativkontrolle zeigen alle drei Markerproteine eine signifikant erhöhte Kolokalisation mit endogenem Mx1. Dieses Ergebnis wurde zusätzlich durch biochemische Studien unterstützt, da die Untersuchungen der Assoziation von Mx1 mit dynamischen Membranen hauptsächlich auf immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen beruhen. Das Vorhandensein von Mx1 auf ERGIC53- und Rab8-positiven Transportvesikeln wurde durch eine Membranaufreinigung mit anschließender Vesikel-Isolation nachgewiesen. Dazu wurden Vesikel, die den apikal transportierten Neurotrophinrezeptor p75<sup>NTR</sup> tragen, mit Hilfe von spezifischen Antikörpern aus polaren, stabil transfizierten MDCK<sub>p75-GFP</sub>-Zellen immunpräzipitiert.

Die Analyse der p75-GFP-positiven Membranen erfolgte mittels Western Blot (Abb. 3.9. E). Die Analyse ergab, dass sich sowohl Mx1 als auch ERGIC53 und Rab8 zusammen auf apikalen *Lipid Raft*-unabhängigen Transportvesikeln befinden. Als Negativkontrolle wurden isolierte p75-GFP-positiv Membranen verwendet, die nur mit unspezifischen IgG-Antikörpern behandelt wurden. Als weitere Negativkontrolle dienten MDCK-Zellen, die kein p75-GFP exprimieren. Die Aufreinigung von Exosomen durch differentielle Zentrifugation aus dem Zellkulturüberstand von polaren MDCK-Zellen ermöglichte den Nachweis, dass sich Mx1 auf Alix-positiven Exosomen befindet. Die exosomale Fraktion enthielt ein weiteres Markerprotein, das Tsg101 (Baietti et al., 2012). Der Nachweis des ER-Enzyms Proteindisulfid-Isomerase (PDI) diente als Kontrolle für eine zytoplasmatische Verunreinigung. Diese Ergebnisse unterstützen die vorherigen Daten und stimmen mit der Beobachtung überein, dass Mx1 und Rab8 auf apikalen Transportvesikeln zu finden sind (Cramm-Behrens et al., 2008; Hoff et al., 2014). Es konnte ebenfalls die Beobachtung gemacht werden, dass Mx1 an Membranen des ERGIC lokalisiert (Accola et al., 2002; Stertz et al., 2006) und Mx1 mit Hilfe von Exosomen durch unkonventionelle Sekretion exportiert wird (Toyokawa et al., 2007a, Racicot et al., 2012).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Mx1 mit verschiedenen Kompartimenten innerhalb der Zelle assoziiert, die an intrazellulären Transportprozessen

beteiligt sind. Sowohl fluoreszenzmikroskopisch als auch biochemisch wurde Mx1 auf post-Golgi Vesikeln identifiziert, deren Bestimmungsort die apikale Membran von MDCK-Zellen ist. Zusätzlich zu dem Nachweis, dass sich Mx1 auf Kompartimenten des frühen sekretorischen Transportweges befindet, war es möglich Mx1, auf Kompartimenten des späten sekretorischen Transportweges zu detektieren.

### **3.2.2. Untersuchung der Assoziation von Mx1 mit intrazellulären Membranstrukturen**

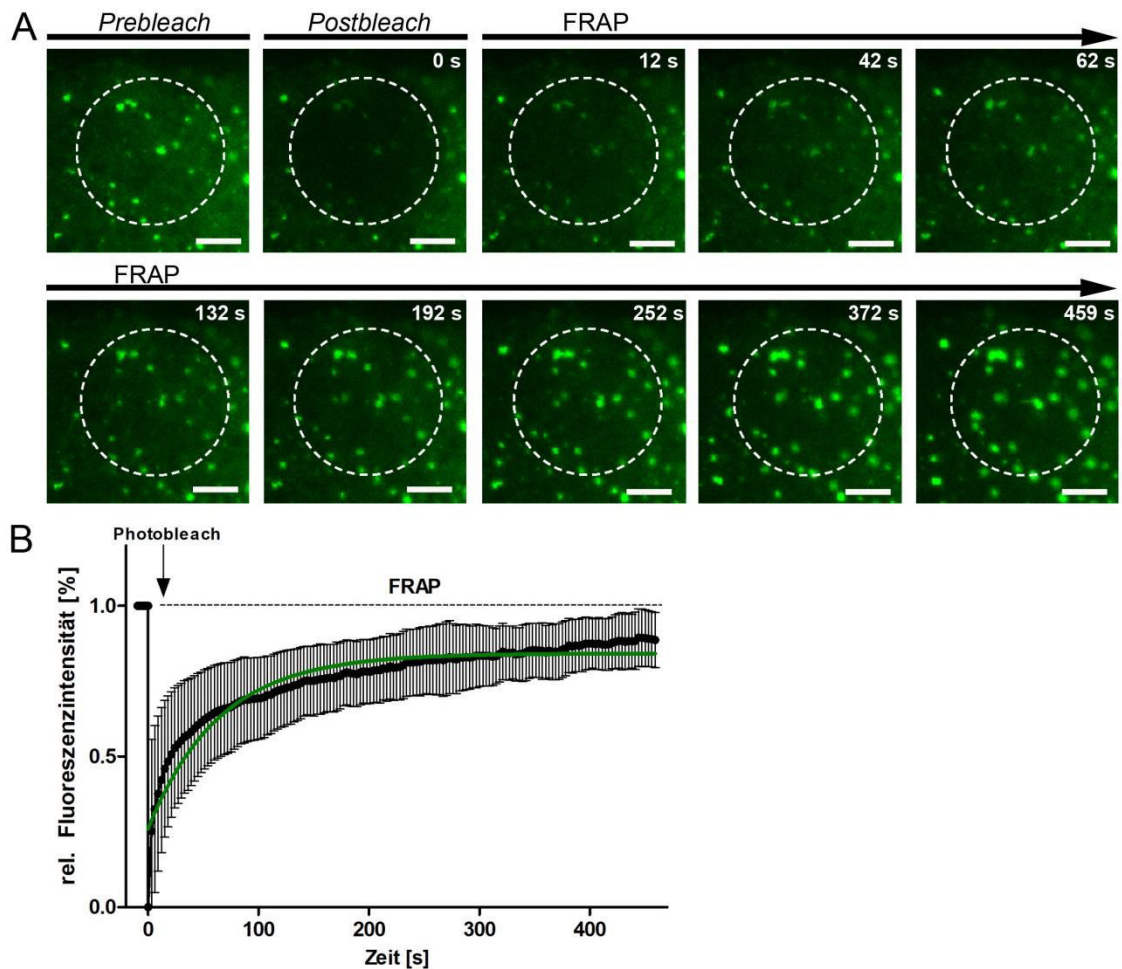
Mx1, das sich auf apikalen post-Golgi Vesikeln befindet, zeigt eine Assoziation mit dynamischen Organellen, die ein hohes Fissions- und Fusionsverhalten aufweisen (Hoff et al., 2014). Um die Frage zu beantworten, welche Rolle Mx1 auf Kompartimenten des frühen und späten sekretorischen Transportweges spielt und um die Dynamik von Mx1-positiven Membranen genauer zu untersuchen, wurden zunächst FRAP-Studien durchgeführt. Mit Hilfe der Fluoreszenztechniken FRAP ist es möglich, das dynamische Verhalten von Mx1-GFP qualitativ und quantitativ zu analysieren. Bei dieser mikroskopischen Technik ist es außerdem möglich, intrazelluläre dynamische Prozesse darzustellen, indem die Fluoreszenz in einem ausgewählten Bereich einer lebenden Zelle, die ein fluoreszierendes Fusionsprotein exprimiert, irreversibel gebleicht wird. Im Anschluss wird die Erholung der Fluoreszenz in diesem Bereich gemessen (Axelrod et al., 1976).

Für die durchgeführte FRAP-Analyse wurden transient mit Mx1-GFP transfizierte COS-7-Zellen ausgewählt. Die Zellen zeigten das schon bereits beschriebene vesikuläre Erscheinungsmuster der Mx1-GFP-positiven Strukturen. Ebenfalls zytosolisch vorhandenes Mx1-GFP war diffus und gleichmäßig über die ganze Zelle verteilt (Abb. 3.10. A: *Prebleach*). Die einzelnen Experimente wurden bei 37°C an einem Leica DMI8 S Mikroskop durchgeführt. Die ausgewählten Regionen wurden mit einer Laserintensität (Anregungswellenlänge: 488 nm) von 75% gebleicht. Dabei gingen die Fluorophore in einen irreversiblen nicht-fluoreszierenden Zustand über. Anschließend wurde die Fluoreszenzgeneration im Bleichfeld über einen gewissen Zeitraum aufgenommen. Die Parameter des Bleichvorgangs wurden so gewählt, dass die Fluoreszenz im gebleichten Areal annähernd der Hintergrundfluoreszenz entsprach. Innerhalb des Areals wurde dadurch neben den Mx1-GFP positiven Strukturen auch Fluorophore im zytosolischen Bereich gebleicht. Allerdings wurde darauf geachtet, dass die vesikulären Strukturen nach dem Bleichvorgang noch zu erkennen waren und eine Schädigung dieser durch eine zu hohe Laserintensität ausgeschlossen war (Abb. 3.10. A: *Postbleach*). Wenige Sekunden nach dem Bleichen kehrte die Fluoreszenz bereits in das Bleichfeld zurück. Gleichzeitig nahm die Fluoreszenzintensität der Mx1-GFP-positiven Strukturen zu, die

sich im Laufe der Messung noch weiter steigerte (Abb. 3.10. A: FRAP). Die Fluoreszenzintensität wurde über den gemessenen Zeitraum von 460 s gemessen. Zur Korrektur wurden gleichzeitig sowohl die Hintergrundfluoreszenz als auch das bildgebungsbedingte Ausbleichen durch Messung der Intensität eines nicht-gebleichten Referenzareals erfasst. Dadurch ist es möglich, die relative Fluoreszenzintensität zu jedem Zeitpunkt der Aufnahme zu bestimmen.

Das Ergebnis der Quantifizierung ist nach der Normalisierung in Abb. 3.10. B dargestellt. Bei der genauen Betrachtung der Daten ist eine zweiphasige Erholung der Fluoreszenzintensität mit einem raschen Anstieg in den ersten 25 s nach dem Bleichvorgang und einem darauffolgenden langsameren Anstieg der Fluoreszenz zu erkennen. Die zeitliche Steigerung der Fluoreszenz ist ein Maß für die Rate des kinetischen Austausches. Nach ungefähr 200 s war ein Sättigungswert im Bleichfeld erreicht. Dieser Wert lag allerdings unter der ursprünglich gemessenen Fluoreszenzintensität vor dem Bleichprozess (gestrichelte Linie). Da eine *full-scale* Normalisierung angewandt wurde und die FRAP-Kurve nach dem Bleichvorgang einen Anfangswert von 0 hat, würde die Kurve einen Wert von 1 (=100%) erreichen, wenn keine immobile Fraktion vorhanden ist. Wenn Werte unterhalb von 1 errechnet werden, spricht dies für ein Vorhandensein einer immobilen Fraktion. Das Verhältnis aus dem Sättigungswert im stationären Zustand und der anfänglichen Fluoreszenzintensität vor dem Bleichen entspricht dem Anteil beweglicher, nicht gebundener Moleküle. Wie in Abb. 3.10. B zu erkennen, beträgt diese immobile Fraktion 17%. Die mobile Fraktion, also die Moleküle die gebunden sind, beträgt bei der FRAP-Analyse von Mx1-GFP ca. 83%. Dies impliziert, dass es sich um eine große Fraktion an unbeweglichen Molekülen handelt, die stabil an vesikuläre Strukturen gebunden sind. Die relativ kleine mobile Fraktion ist vermutlich auf Moleküle, die mit dem Zytoplasma ausgetauscht werden, zurückzuführen. Die errechnete Regenerationszeit der Fluoreszenzzunahme, also die Halbwertszeit  $\tau_{1/2}$ , beträgt 44,27 s.

Mit Hilfe der FRAP-Analysen konnte räumlich sowie zeitlich gezeigt werden, dass die große GTPase mit dynamischen Strukturen assoziiert. Bei diesen Strukturen handelt es sich vermutlich um endosomale Kompartimente (Hoff et al., 2014; Yuan & Sehgal, 2016), die eine Rolle im apikalen Proteintransport spielen, aber auch um Membranen des ERGIC und um MVBs. Anhand dieser Ergebnisse kann darauf geschlossen werden, dass Mx1 eine wichtige Bedeutung für den Transport apikaler Proteine in frühen und späten Schritten des Transportprozesses hat.



**Abb. 3.10. FRAP-Analyse von Mx1-GFP: Mx1 assoziiert dynamisch mit intrazellulären Membranen**  
**(A)** Mikroskopische Zeitreihe der FRAP Analyse durchgeführt in COS-7-Zellen transfiziert mit Mx1-GFP. Gemessen wurde die Intensität des gebleichten Areals (gestrichelter Kreis). Die Fluoreszenzerholung wurde über einen Zeitraum von 460 Sekunden aufgenommen. *Prebleach*: Zeitpunkt vor dem Bleichen (20 Aufnahmen mit einer zeitlichen Auflösung von 0,5 s); *Postbleach*: Zeitpunkt unmittelbar nach dem Bleichen; FRAP: Messung der Fluoreszenzerholung (155 Aufnahmen mit einer zeitlichen Auflösung von 3 s). Maßstab: 5  $\mu$ m. **(B)** Qualitative Analyse der FRAP-Daten. Die Fluoreszenzintensität wurde mit der Leica LAS X Software über die Zeit quantifiziert (n=5). Anschließend wurde eine Doppel- und eine *full-scale*-Normalisierung durchgeführt. Mit GraphPad Prism wurde die Regenerationszeit der Fluoreszenzzunahme (Halbwertszeit  $\tau_{1/2}$ =44,27 s) berechnet. Der Zeitpunkt 0 s zeigt den Punkt an dem der Bleichpuls gesetzt wurde und die Fluoreszenzregeneration startet.

### 3.2.3. Charakterisierung der Dynamik von Mx1-positiven Strukturen

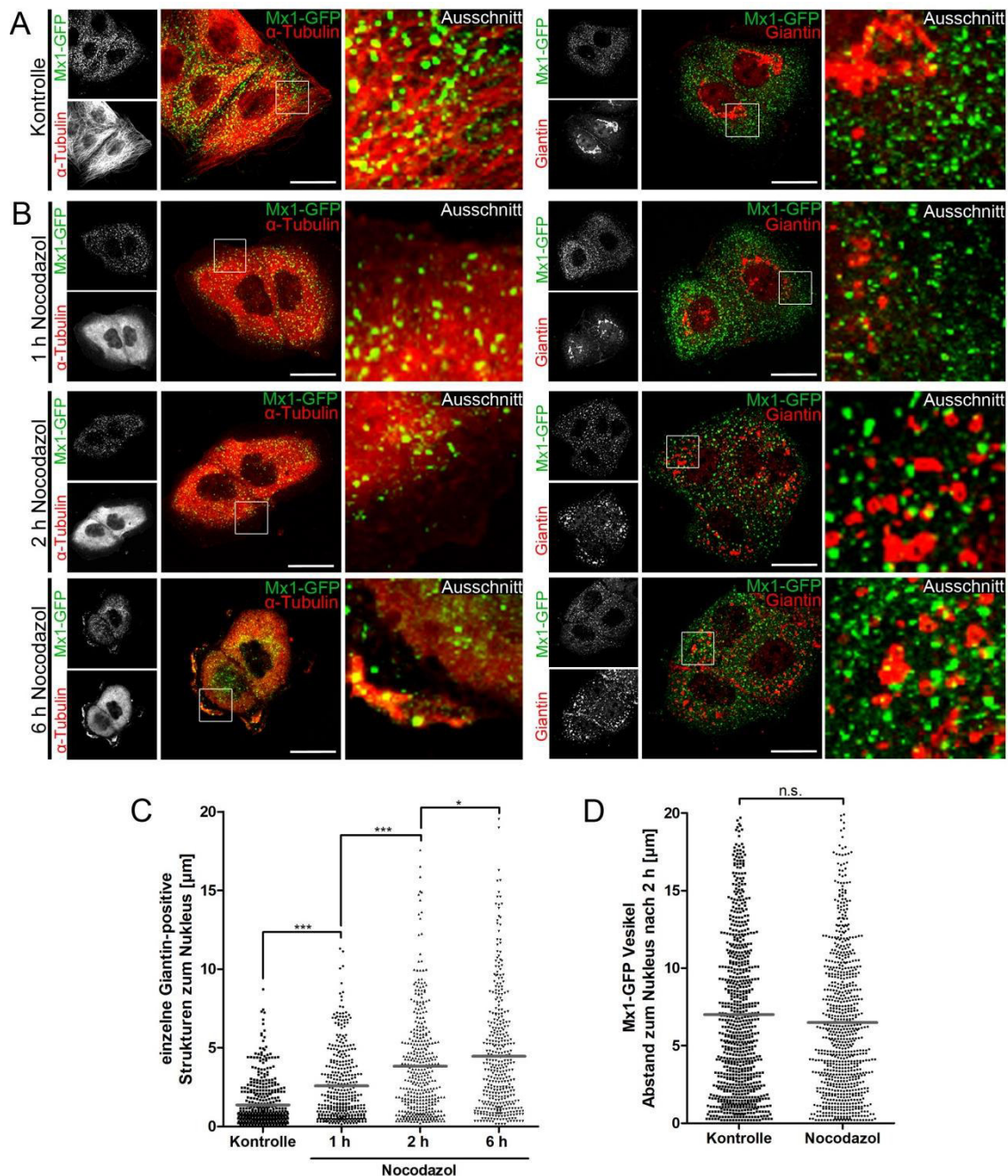
Polare Epithelzellen benötigen für den Transport von Proteinen und damit für die Aufrechterhaltung ihrer Polarität Zytoskelett-Filamente. Entlang dieser Transportwege werden Vesikel und größere Zellkompartimente zu ihrem Bestimmungsort befördert. Vor allem Mikrotubuli spielen bei sekretorischen und endozytotischen Transportwegen eine bedeutende Rolle (Kreitzer et al., 2000; Jacob et al., 2003). Die Assoziation von Mx-Proteinen mit Elementen des Zytoskeletts postulierte Horisberger bereits 1992 nach Co-Präzipitationsexperimenten. Das Mikrotubuli-Netzwerk könnte also für die gezeigten dynamischen Prozesse von Mx1-positive Strukturen (Hoff et al., 2014) verantwortlich sein.

Um herauszufinden, ob die Mx1-abhängige Organisation von Membranen und der Transport von Mx1-positiven Vesikeln entlang von Mikrotubuli stattfinden, wurde die Bewegung von Mx1-GFP-positiven Vesikeln in Abhängigkeit von intakten Tubulin-Filamenten untersucht. Zur Destabilisierung von Mikrotubuli wurde Nocodazol verwendet. Im Anschluss wurde die Mobilität von Strukturen, die Mx1-GFP enthalten, durch Lebendzell-Mikroskopie untersucht und quantitativ ausgewertet. Gleichzeitig wurde die effektive Depolymerisierung der Mikrotubuli überprüft. Dazu wurden unpolare MDCK<sub>Mx1-GFP</sub>-Zellen mit Nocodazol über einen Zeitraum von 1 h, 2 h und 6 h behandelt (Abb. 3.11.) und anschließend immungefärbt sowie konfokalmikroskopisch untersucht.

Die Kontrollzellen, die mit DMSO inkubiert wurden, weisen eine intaktes Netzwerk aus mikrotubulären Filamenten auf (Abb. 3.11. A links). Schon nach der einstündigen Behandlung mit Nocodazol ist eine diffuse Färbung des  $\alpha$ -Tubulins zu erkennen (Abb. 3.11. B links). Vereinzelt können aber noch intakte Mikrotubuli, vor allem in der Nähe des MTOC, beobachtet werden, da sie dort mit ihrem Minus-Ende stabilisiert werden. Die diffuse Färbung ist nach 2 und 6 h noch stärker ausgeprägt, jedoch sind keine filamentösen Strukturen mehr zu erkennen (Abb. 3.11. B links). Eine effektive Mikrotubuli-Depolymerisierung kann zudem durch die Verteilung des Golgi-Komplexes überprüft werden, denn Mikrotubuli sind wichtig bei der Organisation des Golgi-Apparates (Rogalski & Singer, 1984).

Die Zerstörung der Tubulin-Filamente führt aus diesem Grund zur Desorganisation des Golgi-Komplexes und die Golgi-Zisternen liegen über das gesamte Zytoplasma verteilt vor (Thyberg & Moskalewski, 1985). Durch die Immunfärbung von Giantin, ein Golgi-Membranprotein, kann die Verteilung der einzelnen Golgi-Zisternen in Kontrollzellen und den mit Nocodazol behandelten Zellen sichtbar gemacht werden. Die Kontrollzellen zeigen die typische juxtanukleäre Anordnung des mit Giantin gefärbten Golgi-Komplexes (Abb. 3.11. A rechts). Die Quantifizierung zeigt, dass sich die Giantin-positiven Golgi-Stapel in unmittelbarer Nähe zum Zellkern befinden (Abb. 3.11. C). Bei den einstündig behandelten Zellen liegt der Golgi-Apparat bereits leicht verstreut im Zytoplasma vor (Abb. 3.11. B rechts). Eine leichte, aber signifikante Entfernung dieser Strukturen zum Zellkern lässt sich erkennen (Abb. 3.11. C). Nach 2 bzw. 6 h Behandlung ist der Golgi-Apparat in einzelne vesikuläre Elemente zerfallen und liegt über die gesamte Zelle zerstreut vor (Abb. 3.11. B rechts). Die Quantifizierung macht deutlich, dass sich einzelne Golgi-Stapel nach zwei- bzw. sechsständiger Behandlung bis zu 17  $\mu$ m bzw. 19  $\mu$ m weit vom Nukleus entfernt befanden (Abb. 3.11. C). Der Abstand von Mx1-GFP-haltigen Vesikeln zum Zellkern änderte sich nach zweistündiger Nocodazol-Behandlung allerdings nicht signifikant (Abb. 3.11. D). Basierend auf diesen

Beobachtungen wurde eine effektive Depolymerisierung des Mikrotubuli-Systems angenommen.

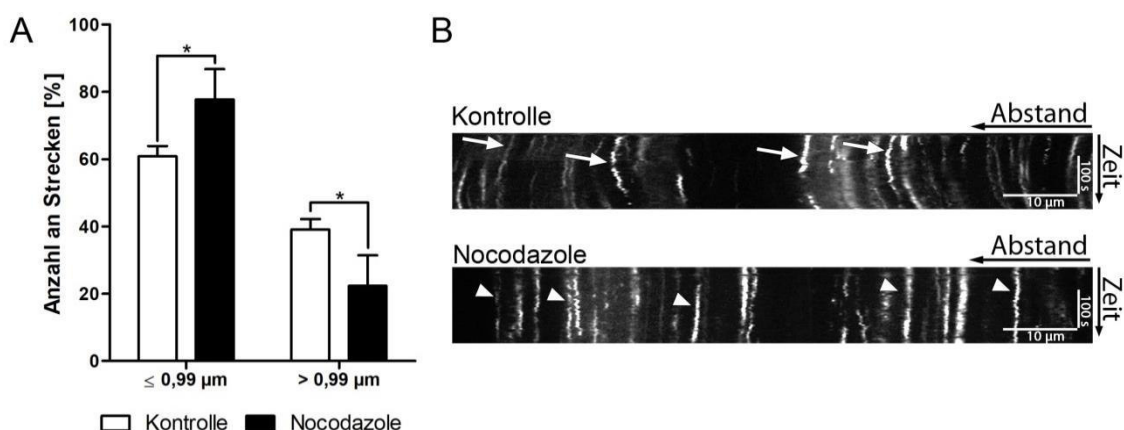


**Abb. 3.11. Rolle von Mikrotubuli in der Dynamik von Mx1-positiven Strukturen**

**(A)-(B)** Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Kontrollzellen **(A)** und Nocodazol behandelten Zellen **(B)** zur Analyse der Integrität von Mikrotubuli sowie der Morphologie und Lokalisation des Golgi-Apparates. Nach einer ein-, zwei- und sechsständigen Behandlung wurden unpolare MDCK<sub>Mx1-GFP</sub>-Zellen fixiert und immungefärbt. Dafür wurden Antikörper gegen  $\alpha$ -Tubulin (Alexa Fluore 647) und Giantin (Alexa Fluore 647) verwendet. Maßstab: 25  $\mu$ m. **(C)** Quantifizierung der Entfernung einzelner Giantin-positiver Golgi-Strukturen zum Zellkern in Kontroll- und behandelten Zellen. Für Kontrollzellen wurden 457 Golgi-Strukturen (n=7 Zellen) ausgewertet. Für Nocodazol behandelte Zellen wurden 374 Golgi-Strukturen (n=7 Zellen) (1 h), 383 Golgi-Strukturen (n=6 Zellen) (2 h) und 373 Golgi-Strukturen (n=5 Zellen) (6 h) ausgewertet. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test. **(D)** Quantifizierung der Entfernung von Mx1-GFP positiven Vesikel zum Zellkern in Kontroll- und behandelten Zellen. Für Kontrollzellen wurden 830 Mx1-eGFP positive Vesikel (n=3 Zellen) und für Nocodazol behandelte Zellen wurden 788 Mx1-eGFP positive Vesikel (n=3 Zellen) ausgewertet. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test.



Um nun die Länge der zurückgelegten Transportstrecken von Mx1-GFP-positiven Strukturen zu bestimmen und anschließend quantitativ darzustellen, wurden lebende Zellen über einen bestimmten Zeitraum mikroskopiert. Hierzu wurden Mx1-GFP-positive Vesikel der unbehandelten und mit Nocodazol behandelten Zellen über einen Zeitraum von 404 Sekunden verfolgt. Anschließend wurde die Länge der zurückgelegten Strecken gemessen. Beim intrazellulären Transport können Vesikel entlang von Aktin- oder Tubulin-Filamenten zu ihrem Bestimmungsort transportiert werden. Daher wird häufig zwischen einem Kurzstreckentransport und einem Langstreckentransport unterschieden. Werden die Längen der Transportstrecken von Mx1-GFP-positiven Vesikeln in einen Kurzstreckentransport ( $\leq 0,99 \mu\text{m}$ ) und einen Langstreckentransport ( $> 0,99 \mu\text{m}$ ) kategorisiert, so lässt sich ein deutlicher Rückgang des Langstreckentransports nach Depolymerisierung der Mikrotubuli erkennen (Abb. 3.12. A). Das Ergebnis zeigt die prozentuale Häufigkeitsverteilung und verdeutlicht, dass in den unbehandelten Zellen 60% der gemessenen Transportstrecken dem Kurzstreckentransport zuzuordnen sind und nur 40% eine Länge von  $> 0,99 \mu\text{m}$  aufweisen. In den behandelten Zellen ist eine signifikante Steigerung im Kurzstreckentransport zu erkennen. 78% der Mx1-GFP-haltigen Strukturen legten in diesen Zellen eine Strecke von  $\leq 0,99 \mu\text{m}$  zurück. Demnach gibt es eine signifikante Reduktion der zurückgelegten Strecken, die in den Langstreckentransport eingeordnet werden. Die Analyse zeigt, dass die Beweglichkeit von Mx1-GFP-positiven Vesikeln abhängig von dem Vorhandensein intakter Tubulin-Filamenten und damit von der Integrität des Mikrotubulinnetzwerks ist.



**Abb. 3.12. Die Dynamik von Mx1-positiven Strukturen ist abhängig von der Mikrotubuli-Integrität**  
**(A)** Unpolare, stabil transfizierte MDCK<sub>Mx1-GFP</sub>-Zellen, mit Nocodazol oder DMSO (Kontrolle) behandelt, wurden für die Lebendzell-Mikroskopie verwendet. Vesikel wurden über 404 Sekunden verfolgt. Ausgewertet wurden nur Vesikel, die länger als 189 Sekunden von der Software erkannt wurden, um verlässlich die zurückgelegten Streckenlängen im Gesamten zu bestimmen. Für Kontrollzellen wurden 3270 und für Nocodazol behandelte Zellen wurden 3119 Mx1-GFP-positive Vesikel analysiert. Die Länge der zurückgelegten Strecken wurde in einen Kurzstreckentransport ( $\leq 0,99 \mu\text{m}$ ) und einen Langstreckentransport ( $> 0,99 \mu\text{m}$ ) eingeteilt. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test,  $n=3$ . **(B)** Repräsentatives Beispiel eines Kymographen zur Darstellung der Mobilität von Mx1-GFP-positiven Vesikeln in Kontroll- und Nocodazol behandelten Zellen. Der Pfeil markiert bewegliche Vesikel, der Pfeilkopf kennzeichnet unbewegliche Vesikel. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ .

Dieses Ergebnis stimmt mit der Ansicht überein, dass der intrazelluläre Transport über lange Entfernungen durch Mikrotubuli gewährleistet wird, wohingegen Aktin-Filamenten den Transport über kürzere Strecken ermöglichen (Langford, 1995). Folglich scheinen sich Mx1-positive Strukturen entlang von Mikrotubuli zu bewegen. Die Erhöhung des Kurzstreckentransports in den Nocodazol behandelten Zellen kann damit erklärt werden, dass das Fehlen intakter Tubulin-Filamente eine Verlagerung zu einem Aktin-abhängigen Transport bedingt. Zur Darstellung der Mobilität Mx1-GFP-positiver Vesikel in Kontrollzellen und behandelten Zellen wurden Kymographen erstellt (Abb. 3.12. B). Mit einem Kymographen kann man die Bewegung von Objekten über die Zeit zweidimensional darstellen. Bewegliche Strukturen zeigen dabei diagonale Intensitätslinien, bei unbeweglichen Strukturen sind diese dagegen gerade verlaufend. Für die Erstellung der Kymographen wurden die Daten der Lebendzellaufnahmen der unbehandelten und behandelten MDCK<sub>Mx1-GFP</sub>-Zellen verwendet. Der Kymograph der Kontrollzellen zeigt eine größere Mobilität der Mx1-GFP-positiven Strukturen im Gegensatz zu den Vesikeln der Nocodazol-behandelten Zellen.

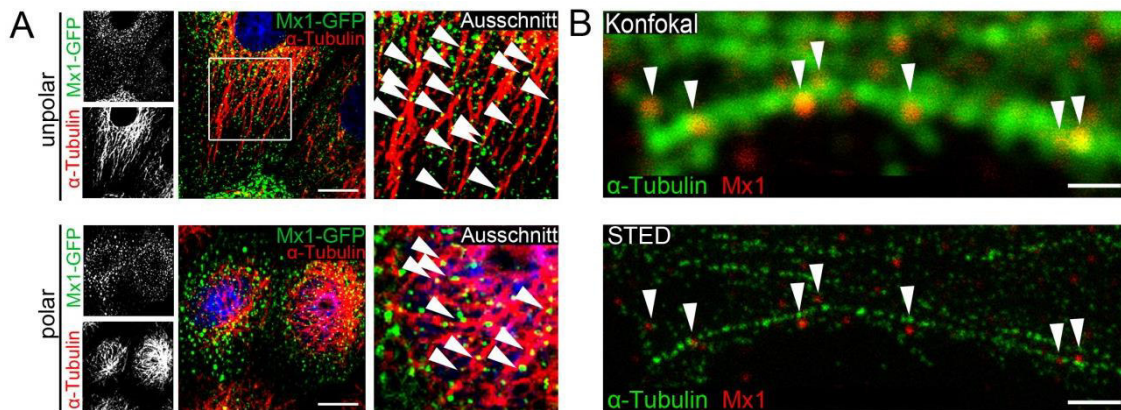
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Mobilität von Mx1-positiven Strukturen abhängig von intakten Mikrotubuli ist und die Depolymerisierung des Mikrotubuli-Netzwerkes eine signifikante Reduzierung des Langstreckentransports dieser Strukturen bedingt. In Nocodazol behandelten MDCK<sub>Mx1-GFP</sub>-Zellen werden die Vesikel fast ausschließlich über kurze Transportstrecken ( $\leq 0,99 \mu\text{m}$ ) transportiert.

#### 3.2.4. Mx1 assoziiert mit dem Mikrotubuli-Netzwerk

Aufgrund der beobachteten Dynamik der Mx1-positiven Strukturen und der Abhängigkeit dieser Mobilität von intakten Mikrotubuli sollte die Assoziation von Mx1 mit dem Mikrotubuli-Netzwerk genauer untersucht werden. Zunächst wurde in MDCK<sub>Mx1-GFP</sub>-Zellen durch Immunfluoreszenz das Tubulin-Zytoskelett mit Hilfe eines  $\alpha$ -Tubulin Antikörpers visualisiert und im KLSM analysiert. Die Immunfärbung zeigte deutlich die Anordnung Mx1-GFP-haltiger Kompartimenten entlang von Mikrotubuli sowohl in unpolaren als auch in polaren MDCK-Zellen (Abb. 3.13. A). Die übereinandergelegten Aufnahmen zeigten auch, dass Mx1-GFP-enthaltende Vesikel sich in unmittelbarer Nähe zu Mikrotubuli befinden und mit ihnen auch verknüpft sind. Um diese räumliche Nähe von Mx1-positiven Strukturen und Mikrotubuli-Filamenten zu bestätigen, wurde das hochauflösende STED-Mikroskopieverfahren verwendet. Für diese Analyse wurden unpolare MDCK-Zellen, die gegen endogenes Mx1 und  $\alpha$ -Tubulin immungefärbt wurden, verwendet. Das STED-Mikroskop lieferte gleichzeitig ein herkömmliches, konfokales Bild sowie ein STED-Bild des gleichen Ausschnitts der Zelle. Das überlagerte KLSM- sowie das STED-Bild sind in Abb. 3.13. B dargestellt. Dabei wird der hohe



Auflösungsunterschied deutlich erkennbar. Das STED-Bild zeigt einzelne Mikrotubuli-Stränge, die im konfokalen Bild nur breite, verschwommene Strukturen bilden. Außerdem sind Vesikel, die endogenes Mx1 enthalten, abgebildet. Diese befinden sich dicht neben den einzelnen Mikrotubuli-Filamenten.



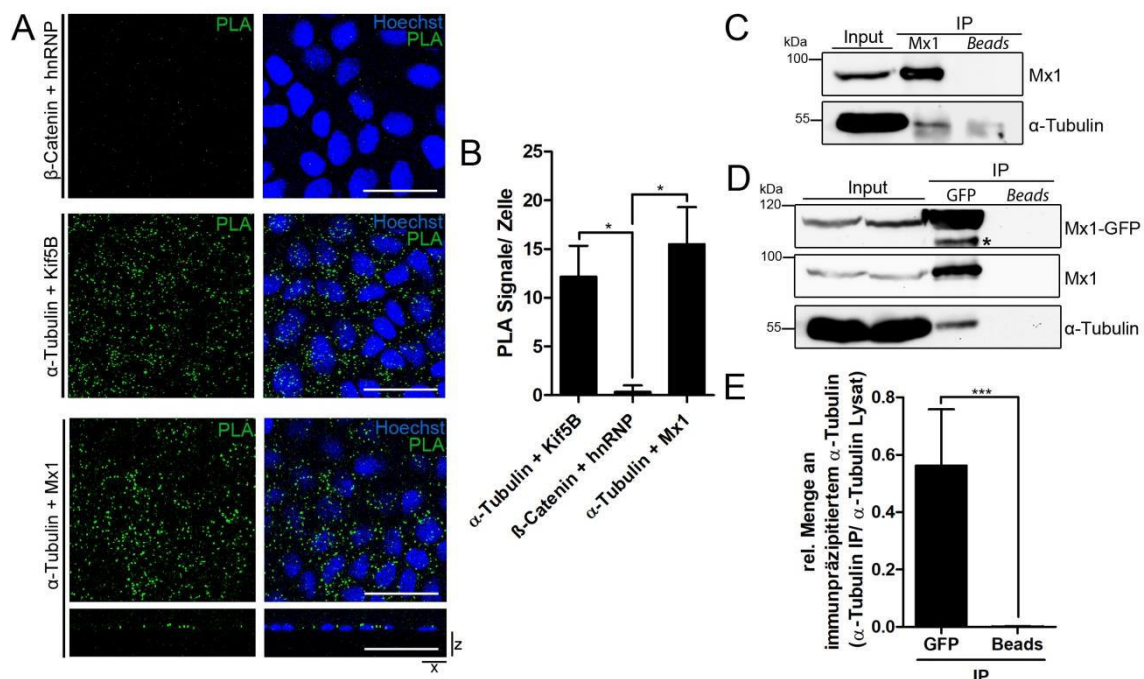
**Abb. 3.13. Visualisierung von Mx1 und Mikrotubuli**

(A) Unpolare und polare MDCK<sub>Mx1-eGFP</sub>-Zellen wurden fixiert und eine Immunfluoreszenz mit  $\alpha$ -Tubulin (Alexa Fluor 647) durchgeführt. Die Präparate wurden im KLSM analysiert. Auffällig ist die Anordnung der Mx1-GFP-positiven Strukturen entlang von Mikrotubuli-Strängen (Pfeilköpfe). Kerne sind in blau dargestellt. Maßstab: 10  $\mu$ m. (B) Für Zweifarben-STED Aufnahmen wurden unpolare MDCK Zellen fixiert und endogenes Mx1 (StarRed) und  $\alpha$ -Tubulin (Star580) immungefärbt. Dargestellt ist eine konfokalmikroskopische Aufnahme (KLSM) und eine Aufnahme im dem STED-Mikroskop (STED) eines identischen Ausschnitts. Die Pfeilköpfe markieren Mx1-positive Strukturen, die sich in unmittelbarer Nähe zu Mikrotubuli befinden. Maßstab: 1  $\mu$ m.

Für die weitere Untersuchung der physikalischen Nähe von Mx1 zum Tubulin-Zytoskelett wurde der *Proximity Ligation Assay* (PLA) verwendet. Mit Hilfe dieser sehr sensitiven Methode ist es möglich, die Bindung von Mx1 an  $\alpha$ -Tubulin zu bestätigen sowie die subzelluläre Lokalisation dieser Assoziation eindeutig zu bestimmen. Die Assoziation zwischen zwei Proteinen wird dabei durch fluoreszierende, punktuelle Signale in den Zellen im Mikroskop dargestellt. Für die Durchführung wurden polare MDCK-Zellen verwendet.

Es zeigte sich, dass im Vergleich zur Negativkontrolle, bestehend aus  $\beta$ -Catenin und dem im Nukleus vorhandenen RNA bindenden Protein hnRNP, eine große Menge an PLA-Signalen zwischen Mx1 und  $\alpha$ -Tubulin detektiert werden konnte (Abb. 3.14. A). Dies bestätigt die räumliche Nähe der beiden Proteine zueinander. Durch x/z-Aufnahmen wurde deutlich, dass die Interaktionsereignisse hauptsächlich an der apikalen Membran stattfinden. Für die Positivkontrolle wurde das bereits bestätigte Interaktionspaar  $\alpha$ -Tubulin und Kif5B verwendet. Diese lieferte eine hohe Dichte an eindeutigen PLA-Signalen. Die nachfolgende quantitative Auswertung der PLA-Signale ergab, dass für Mx1 und  $\alpha$ -Tubulin signifikant mehr PLA-Ereignisse im Vergleich zur Negativkontrolle vorlagen (Abb. 3.14. B). Dieses Ergebnis bestätigt die physikalische Nähe von Mx1 und  $\alpha$ -Tubulin (unter 40 nm).

Aufgrund dieser Beobachtungen ergab sich die Frage, ob die räumliche Verbindung zwischen Mx1-enhaltenden Strukturen und den Mikrotubuli auf einer direkten oder indirekten Bindung basiert. Um dieser Fragestellung nachzugehen und um  $\alpha$ -Tubulin als Interaktionspartner von Mx1 biochemisch zu bestätigen, wurden Immunpräzipitationen (IP) von Mx1-GFP sowie endogenem Mx1 durchgeführt. Die bei diesem experimentellen Ansatz bedingte Anreicherung von Mx1 und Mx1-bindenden Proteinen ermöglicht die Identifikation der isolierten Proteine mittels Immunoblot. Zunächst wurde eine Immunpräzipitation von endogenem Mx1 aus MDCK-Zellen durchgeführt. Dafür wurde ein monoklonaler anti-Mx1 Antikörper verwendet. Die IP-Probe (IP+) zeigt, dass endogenes Mx1 spezifisch immunpräzipitiert wurde. Außerdem konnte  $\alpha$ -Tubulin im Immunoblot nachgewiesen werden (Abb. 3.14. C).

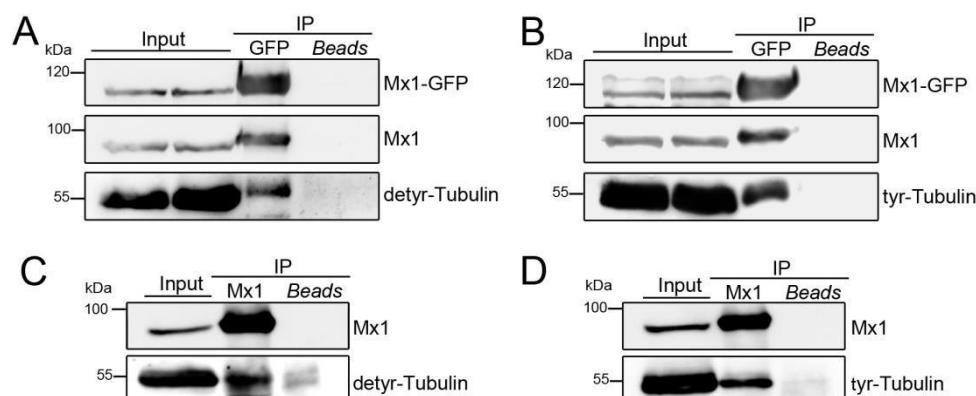


**Abb. 3.14. Mx1 assoziiert mit Mikrotubuli**

**(A)** Proximity Ligation Assay von Mx1 und  $\alpha$ -Tubulin. Für die Durchführung des PLA wurden polare MDCK-Zellen verwendet, die in x/y- und x/z-Ebene im KLSM analysiert wurden. Die repräsentativen, fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen eine große Anzahl an PLA-Signalen bei der Verwendung von Primärantikörpern gegen Mx1 und  $\alpha$ -Tubulin. Die Negativkontrolle, bestehend aus hnRNP und  $\beta$ -Catenin, zeigten sich wenige Signale. Das Interaktionspaar  $\alpha$ -Tubulin und Kif5B diente als Positivkontrolle. Zellkerne wurden mit Hoechst33342 (blau) gefärbt. Maßstab: 50  $\mu$ m. **(B)** Quantifizierung der PLA-Signale pro Zelle aus Experimenten wie in **A**. n=3, 10 Zellen pro Versuch. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test. **(C)** Co-Immunpräzipitation von endogenem Mx1 und  $\alpha$ -Tubulin. Die Immunpräzipitation erfolgte mit einem gegen Mx1 gerichteten Antikörper. Die durch *Dynabeads* isolierten Immunkomplexe wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und Mx1 sowie  $\alpha$ -Tubulin im Western Blot detektiert. **(D)** Interaktionsanalyse von Mx1-GFP mit polaren MDCK<sub>Mx1-eGFP</sub>-Zellen. Das Fusionsprotein Mx1-GFP und seine Bindepartner wurden mit Hilfe von GFP-Nanobody-Trap *Beads* immunpräzipitiert. Die isolierten Immunkomplexe wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot auf die Anwesenheit von Mx1 und  $\alpha$ -Tubulin untersucht.  $\alpha$ -Tubulin wurde als Bindepartner identifiziert. Der Stern markiert eine Abbaubande von Mx1-GFP. **(E)** Quantifizierung der Ergebnisse aus Experimenten wie in **C**. Mx1-GFP bindet signifikante Mengen von  $\alpha$ -Tubulin in polaren MDCK-Zellen. Darüber hinaus konnte endogenes Mx1 mit Mx1-GFP interagieren und wurde dadurch ebenfalls co-präzipitiert. Dies bestätigt, dass Mx1-GFP die Fähigkeit zur Oligomerisierung hat. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einer zweifaktoriellen ANOVA und Bonferroni-Post-Test, n=3.

Zusätzlich wurde eine Immunpräzipitation von Mx1-GFP durchgeführt. Dazu wurden GFP-*Nanobody-Trap Beads* verwendet, die eine sehr effektive aber zugleich sensitive Identifikation potentieller Assoziationspartner von Mx1 ermöglichten. Dabei konnte  $\alpha$ -Tubulin als spezifischer Bindepartner von Mx1 identifiziert werden (Abb. 3.14. D). Die IP-Analyse ergab außerdem, dass sowohl das präzipitierte Mx1-GFP als auch endogenes Mx1, das ein kleineres Molekulargewicht hat, angereichert und im Immunoblot detektiert wurden. Dies bestätigt die bereits beschriebene Fähigkeit von Mx1, Homo-Oligomere ausbilden zu können (Haller et al., 2010). Die Quantifizierung der Immunoblots ergab, dass signifikante Mengen an  $\alpha$ -Tubulin mit der großen GTPase co-präzipitierten (Abb. 3.14. E). Die Immunpräzipitation wurde überprüft, indem MDCK-Zellen verwendet wurden, die nicht-fusioniertes GFP exprimieren (s. Abb. 6.3.). Die unspezifische Interaktion von  $\alpha$ -Tubulin mit GFP konnte dabei ausgeschlossen werden.

Aufgrund der Identifizierung von  $\alpha$ -Tubulin als Bindepartner von Mx1 sollte biochemisch aufgeklärt werden, ob Mx1 eine bevorzugte Assoziation an detyrosinierte oder tyrosinierte Mikrotubuli zeigt. Die posttranslationalen Modifikationen markieren die Oberfläche der Tubulin-Polymere und beeinflussen damit die Interaktion von Tubulin mit assoziierten Proteinen. Auf diese Weise fungieren sie als Wegweiser für MAPs bzw. Motorproteine, die im intrazellulären Transport beteiligt sind (Lin et al., 2002; Zink et al., 2012). In mehreren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene Proteine bevorzugt an bestimmte posttranslational modifizierte Mikrotubuli binden. Zum Beispiel bindet das Motorprotein Kinesin-1 (Kif5B und Kif5C) bevorzugt an detyrosiniertes Tubulin, was den Transport verschiedener Transportvesikel entlang dieser Mikrotubuli ermöglicht (Liao & Gundersen, 1998; Lin et al., 2002; Dunn et al., 2008). Ausgangsmaterial für die Präzipitationsexperimente waren stabil transfizierte MDCK<sub>Mx1-GFP</sub>-Zellen (Abb. 3.15. A und B) und MDCK-Zellen (Abb. 3.15. C und D).



**Abb. 3.15. Mx1 assoziiert mit detyrosiniertem und tyrosiniertem  $\alpha$ -Tubulin**

(A)-(B) Co-Immunpräzipitation von Mx1-GFP mit Hilfe von GFP-*Nanobody-Trap Beads*. Sowohl detyr- (A) als auch tyr-Tubulin (B) konnte angereichert und im Western Blot nachgewiesen werden. (C)-(D) Co-Immunpräzipitation von endogenem Mx1 und detyr- (C) als auch tyr-Tubulin (D). Die Immunpräzipitation erfolgte mit einem gegen Mx1 gerichteten Antikörper. Die durch *Dynabeads* isolierten Immunkomplexe wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot durch die Verwendung spezifischer Antikörper gegen Mx1, detyrosiniertes und tyrosiniertes Tubulin detektiert. In Zusammenarbeit mit Jana Riehl.

Durch die biochemische Analyse konnte festgestellt werden, dass sowohl detyrosiniertes als auch tyrosiniertes  $\alpha$ -Tubulin mit Mx1-GFP und endogenem Mx1 co-präzipitieren. Die Anreicherung beider posttranslational modifizierter Varianten von  $\alpha$ -Tubulin könnte darauf beruhen, dass ein Mikrotubulus aus alternierenden Segmenten von detyrosiniertem und tyrosiniertem Tubulin besteht (Geuens et al., 1986; Zink et al., 2012).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Analysen sowie des PLA und der Co-Immunpräzipitationen darauf hin, dass Mx1 in lebenden Zellen und *in vitro* direkt oder indirekt an  $\alpha$ -Tubulin bindet. Diese Interaktion findet hauptsächlich an der apikalen Domäne polarer Zellen statt und unterstützt damit die Beobachtungen, dass Mx1 eine wichtige Rolle im apikalen Proteintransport besitzt. Allerdings konnte dabei nicht herausgefunden werden, ob Mx1 bevorzugt an detyrosiniertes oder tyrosiniertes Tubulin bindet.

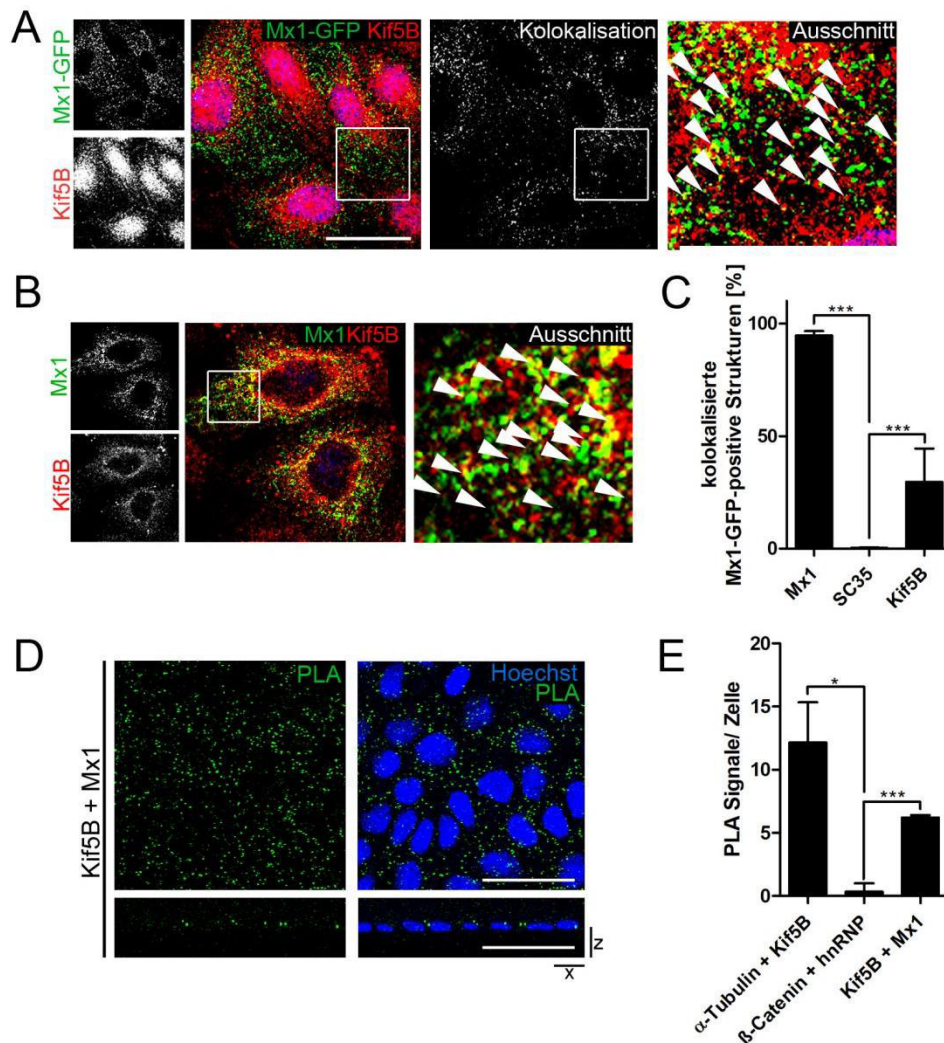
### 3.2.5. Mx1 interagiert mit dem Motorprotein Kif5B

Durch die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte die räumliche Nähe von Mx1-positiven Strukturen zu einzelnen Mikrotubuli-Strängen gezeigt werden. Zusammen mit der Beobachtung, dass Mx1 direkt oder indirekt mit  $\alpha$ -Tubulin assoziiert, entwickelte sich daraus die Hypothese, dass möglicherweise mit Hilfe von Mx1 apikale Transportvesikel an Motorproteine gebunden und so entlang von Mikrotubuli transportiert werden. Mx1, das eine Komponente von apikalen Vesikeln ist (Hoff et al., 2014), könnte dabei eine funktionelle Rolle als Bindeglied zwischen Vesikel, Motorprotein und Mikrotubuli einnehmen. Für Kif5B wurde gezeigt, dass mit Hilfe dieses Motorproteins apikale Transportvesikel zu ihrem Bestimmungsort entlang von Mikrotubuli transportiert werden (Jaulin et al., 2007; Astanina & Jacob, 2010). Kif5B stellt damit einen möglichen Bindepartner von Mx1 sowie ein Bindeglied zwischen Mx1 und Mikrotubuli dar. Diese Annahme sollte durch verschiedene fluoreszenzmikroskopische und biochemische Analysen bestätigt werden.

Dazu wurde zunächst die subzelluläre Verteilung von Mx1-GFP und Kif5B mit Hilfe einer Antikörper-Färbung im KLSM analysiert (Abb. 3.16. A). Die konfokalen Aufnahmen der MDCK<sub>Mx1-GFP</sub>-Zellen zeigten eine partielle Überlappung der Signale. Da das besondere Interesse an Kif5B bestand, wurde endogenes Mx1 zusammen mit Kif5B immunologisch visualisiert und im KLSM untersucht (Abb. 3.16. B). Auch hier konnte ein überlappendes Signal der beiden Proteine beobachtet werden. Für die Quantifizierung der Kolo-kalisation von Mx1 mit Kif5B wurden zunächst die vesikulären Strukturen beider Kanäle bestimmt und anschließend dafür der Manders Koeffizient berechnet. Dabei zeigte sich, dass in MDCK-Zellen 30% der Mx1-Strukturen mit Kif5B überlappten (Abb.



**3.16. C).** Als Negativkontrolle fungierte SC35, das mit einem Anteil von nur 0,2% mit Mx1-positiven Vesikeln kolokalisierte. Eine 95%-ige Kolokalisation ergab sich bei der Verwendung eines monoklonalen und polyklonalen Mx1-Antikörpers (s. Abb. 3.9.).



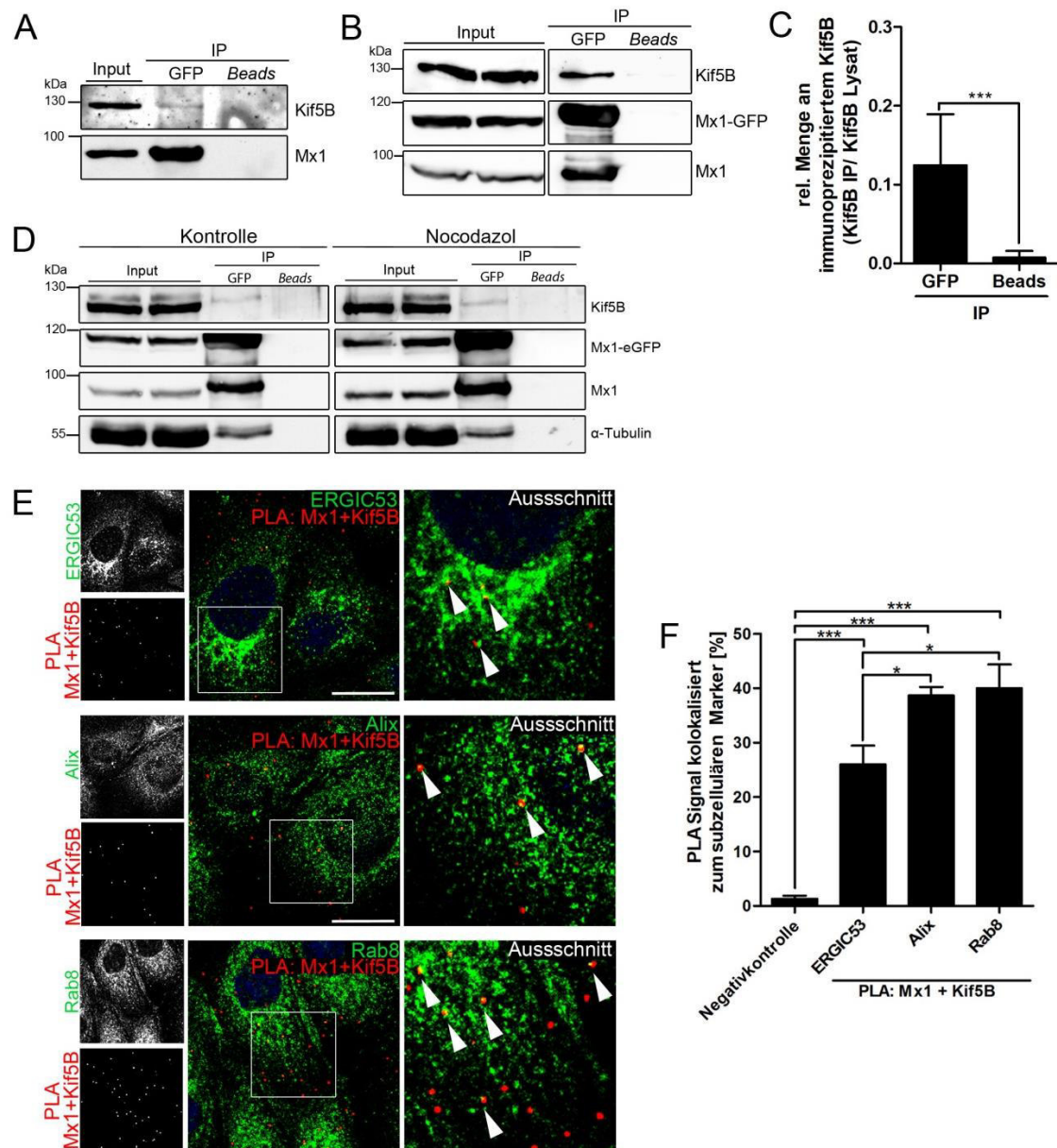
**Abb. 3.16. Mx1 assoziiert mit Mitgliedern der Kinesin-1-Familie, insbesondere mit Kif5B**

**(A)** Unpolare MDCK<sub>Mx1-eGFP</sub>-Zellen wurden fixiert und gegen Kif5B (Alexa Fluor 647) immungefärbt. Zur Veranschaulichung wurden kolokalisierte Strukturen mithilfe eines eigenen Kanals dargestellt (weiß). Strukturen, die positiv für Mx1 und dem entsprechenden Motorprotein sind, sind in den Bildausschnitten mit Pfeilköpfen markiert. Der Zellkern sind in blau dargestellt. Maßstab: 25  $\mu$ m. **(B)** Kolokalisationsstudien zwischen endogenem Mx1 und Kif5B in immungefärbten MDCK-Zellen. Kolokalisierte Strukturen wurden durch Pfeilköpfe im Ausschnitt markiert. Maßstab: 25  $\mu$ m. **(C)** Quantifizierung der Kolokalisationsereignisse aus Experimenten wie in **B** mithilfe des Manders Koeffizienten. Ausgewertet wurden n=32 Zellen für Mx1 und Kif5B, n=14 Zellen für die Mx1-Doppelfärbung und n=32 Zellen für die Negativkontrolle bestehend aus SC35 und Mx1. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test, n=3. **(D)** In polaren MDCK-Zellen wurde ein PLA durchgeführt und anschließend im KLSM analysiert. Eine Vielzahl an PLA-Signalen konnte bei der Verwendung von Antikörpern gegen Mx1 und Kif5B detektiert werden. Der x/z-Scan zeigt die Assoziation der beiden Proteine hauptsächlich im subapikalen Bereich. Kerne sind in blau dargestellt. Maßstab: 50  $\mu$ m. **(E)** Quantifizierung der detektierten PLA-Signale pro Zelle. Positivkontrolle:  $\alpha$ -Tubulin und Kif5B, Negativkontrolle:  $\beta$ -Catenin und hnRNP. Die PLA-Signale für Mx1 und Kif5B sind im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant erhöht. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test, n=3.

Um dies zu evaluieren und um die Bindung von Mx1 an Kif5B zu überprüfen, wurden zunächst Immunpräzipitationen von endogenem Mx1 (Abb. 3.17. A) und Mx1-GFP (Abb.

3.17. B) durchgeführt. Tatsächlich konnte dabei Kif5B als neuer Interaktionspartner von Mx1 identifiziert werden. Im Vergleich zur Negativkontrolle (*Beads*) konnten signifikante Mengen an Kif5B zusammen mit Mx1 angereichert werden (Abb. 3.17. C). Dies bestätigt, dass Mx1 direkt oder indirekt und spezifisch mit dem Motorprotein Kif5B interagiert. Die GFP-Immunpräzipitation wurde überprüft, indem nicht-fusioniertes GFP-Protein in MDCK-Zellen exprimiert und mit GFP-*Nanobody*-Trap *Beads* angereichert wurde. Im Immunoblot wurden mögliche Co-Präzipitationen getestet (s. Abb. 6.3.). Allerdings konnte eine unspezifische Interaktion von Kif5B mit GFP ausgeschlossen werden. Um zu überprüfen, ob die Assoziation von Mx1 mit Kif5B und  $\alpha$ -Tubulin auch nach Depolymerisierung des Tubulin-Zytoskeletts bestehen bleibt, wurden MDCK<sub>Mx1-GFP</sub>-Zellen mit DMSO (Kontrolle) bzw. mit Nocodazol behandelt. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation von Mx1-GFP durchgeführt (Abb. 3.17. D). Interessanterweise wurde die Interaktion zwischen Mx1, Kif5B und  $\alpha$ -Tubulin durch Depolymerisierung der Mikrotubuli nicht aufgelöst.

Als Nächstes sollte die Identität der Mx1-positiven vesikulären Strukturen, die mit Kif5B in Verbindung treten, aufgeklärt werden. Hierzu wurden MDCK-Zellen einem PLA unterzogen und gleichzeitig gegen Markerproteine für Kompartimente des frühen und späten sekretorischen Transportweges immungefärbt. Wie in Abb. 3.17. E gezeigt, konnten sowohl die PLA-Signale, die die Interaktion von Mx1 und Kif5B darstellen, als auch ERGIC53-, Rab8- und Alix-positive Kompartimente visualisiert werden. Das ER-Golgi Intermediärkompartiment zeigte die typische perinukläere sowie punktförmige Lokalisation innerhalb der Zelle. Für Rab8 und Alix konnte die typische vesikuläre Verteilung, die sich über das ganze Zytoplasma erstreckte, beobachtet werden. In einigen Fällen kam es zu einer eindeutigen Überlappung dieser Strukturen mit den PLA-Signalen. Die Quantifizierung der kolokalisierten PLA-Signale mit dem jeweiligen Markerprotein, die mit Hilfe des Manders Koeffizienten erfolgte, machte deutlich, dass die PLA-Signale vor allem den Rab8- und Alix-positiven Endosomen zugeordnet werden konnten (Abb. 3.17. F). 39% bzw. 40% der detektierten PLA-Signale kolokalisierten mit Alix-positiven bzw. Rab8-positiven Endosomen. Im Gegensatz dazu ergab sich nur eine 25%-ige Überlappung der PLA-Ereignisse mit ERGIC-53. Als Negativkontrolle fungierten Zellen, die mit Antikörpern gegen hnRNP und  $\beta$ -Catenin sowie mit einem Alexa Fluor 488 Sekundärantikörper behandelt wurden. Damit kolokalisierten signifikant weniger PLA-Signale mit dem Markerprotein für den frühen sekretorischen Transportweg als mit den endosomalen Markerproteinen. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass vor allem Mx1-haltige Endosomen sowie MVBs direkt oder indirekt mit Kif5B interagieren.



**Abb. 3.17. Mx1 interagiert mit dem Motorprotein Kif5B**

(A) Co-Immunpräzipitation von endogenem Mx1 und Kif5B. Die Immunpräzipitation erfolgte mit einem gegen Mx1 gerichteten Antikörper. Die durch *Dynabeads* isolierten Immunkomplexe wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und Mx1 sowie Kif5B im Western Blot detektiert. (B) Interaktionsanalyse von Mx1-GFP mit polaren MDCK<sub>Mx1-eGFP</sub>-Zellen. Das Fusionsprotein Mx1-GFP und seine Bindepartner wurden mit Hilfe von GFP-*Nanobody*-Trap *Beads* immunpräzipitiert. Die isolierten Immunkomplexe wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot auf die Anwesenheit von Mx1 und Kif5B untersucht, n=8. (C) Quantifizierung der Ergebnisse aus Experimenten wie in B. Mx1-GFP bindet signifikante Mengen von Kif5B in polaren MDCK-Zellen. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test, n=8. (D) Co-Immunpräzipitation mit DMSO (Kontrolle) oder Nocodazol behandelten, polaren MDCK<sub>Mx1-eGFP</sub>-Zellen. Die isolierten Immunkomplexe wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot auf die Anwesenheit von Mx1, Kif5B und  $\alpha$ -Tubulin untersucht, n=3. (E) PLA und Immunfärbung wurden kombiniert, um die Identität der Mx1-positiven Vesikel, die mit Kif5B assoziieren, aufzuklären. Zellen wurden dabei einem PLA bestehend aus Kif5B und Mx1 (monoklonal oder polykonal) unterzogen und gleichzeitig gegen ERGIC53, Alix oder Rab8 immungefärbt, n=3. (F) Quantifizierung der ERGIC53-(n=51 Zellen), Alix-(n=40 Zellen) und Rab8-(n=64 Zellen) positiven Signale, die mit PLA-Signalen kolokalisieren. Dafür wurde der Manders' Koeffizient verwendet. Als Negativkontrolle dienten hnRNP und  $\beta$ -Catenin Antikörper zusammen mit einem Alexa Fluor 488 Sekundärantikörper. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test, n=3.

### 3.2.6. Der *Knockout* von Mx1 führt zu einer verringerten Proteinsekretion

Zur weiteren Untersuchung der bereits dokumentierten funktionellen Rolle von Mx1 im intrazellulären Transport (Hoff et al., 2014) wurden zunächst Zellen mit einem CRISPR/Cas9-induzierten *Knockout* für Mx1 erstellt. Die Effizienz des *Knockouts* wurde mittels eines Western Blots unter Verwendung eines monoklonalen Mx1-Antikörpers verifiziert. Mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Methode war es möglich, eine Mx1-*Knockout*-Zelllinie (MDCK<sub>ΔMx1</sub>) zu erstellen, die keine Expression von Mx1 aufweist.

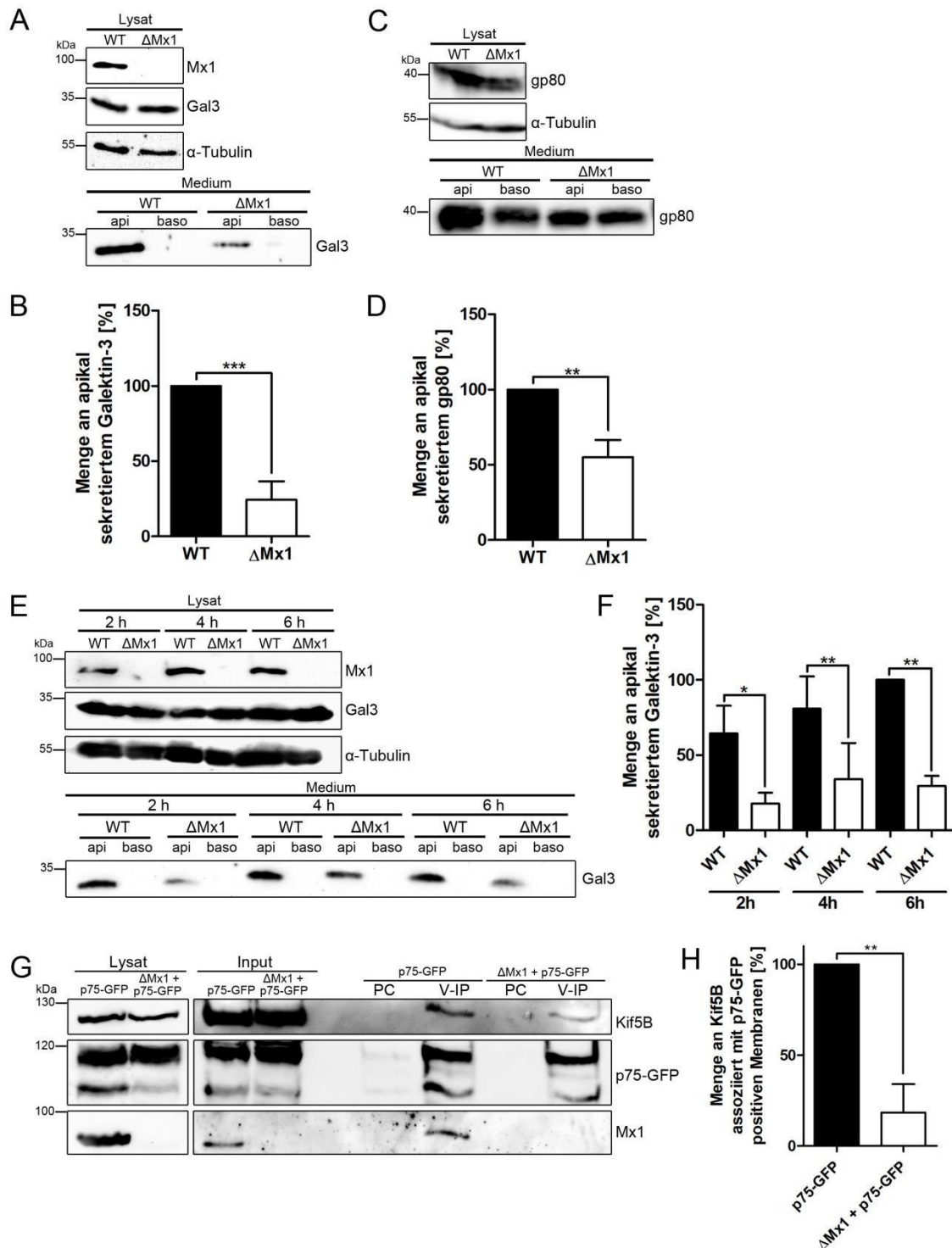
Für die Überprüfung, ob Mx1 am intrazellulären Proteintransport beteiligt ist, wurde das apikale und basolaterale Medium von auf PET-Filtern kultivierten, polaren MDCK- und MDCK<sub>ΔMx1</sub>-Zellen gesammelt. Daraufhin wurde die Sekretion von Galektin-3 (Gal3) und Clusterin/gp80 durch das Western Blot Verfahren analysiert. Die Sekretion von Gal3 findet dabei ausschließlich an der apikalen Domäne statt (Lindstedt et al., 1993; Hönig et al., 2018). Wie in Abb. 3.18. A dargestellt, wurde das Lektin hauptsächlich im apikalen Medium von MDCK-Zellen (WT) und MDCK<sub>ΔMx1</sub>-Zellen (ΔMx1) gefunden, während der basolaterale Transportprozess unberührt bleibt. Somit kann ein Fehlsortieren an die basolaterale Membran durch das Fehlen von Mx1 ausgeschlossen werden. Allerdings wird deutlich, dass die apikale Sekretion von Gal3 in Mx1-*Knockout*-Zellen deutlich reduziert war. Dies wird auch durch die Quantifizierung ersichtlich (Abb. 3.18. B). Nur 25% des Gal3 gelangten ohne die Anwesenheit von Mx1 über die apikale Membran ins Medium.

Ein ähnliches Ergebnis konnte mit dem Glykoprotein Clusterin/gp80 erzielt werden. Dieses Protein wird vorwiegend apikal sekretiert, ist aber auch im basolateralen Medium zu detektieren (Urban et al., 1987; Parczyk & Kondor-Koch, 1989). Im Western Blot war für das apikale Medium der MDCK<sub>ΔMx1</sub>-Zellen deutlich weniger Clusterin/gp80 als in MDCK-Zellen nachzuweisen (Abb. 3.18. C). Die Quantifizierung ergab eine signifikante Reduktion der apikalen Sekretion von Clusterin/gp80 nach einem *Knockout* von Mx1 (Abb. 3.18. D). Nur noch 50% des Glykoproteins wurden in das apikale Medium sekretiert. Um sicher zu gehen, dass der Effekt dabei nicht auf eine Verzögerung bzw. langsamere Sekretion zurückzuführen ist, wurde eine Sekretionskinetik durchgeführt. Dabei wurde apikales und basolaterales Medium über 2, 4 und 6 h gesammelt und im Immunoblot untersucht (Abb. 3.18. E). Es zeigte sich eine leichte Erhöhung der Menge von apikal sekretiertem Gal3 nach einer Zeitspanne von 4 h im Vergleich zu einer Sekretionsdauer von 2 h. Allerdings konnte keine Veränderung in der Menge an apikal sekretiertem Gal3 mehr über die Zeitspanne von vier bis 6 h beobachtet werden (Abb. 3.18. F).

Folglich sind der Transport und die Sekretion von Gal3 in MDCK<sub>ΔMx1</sub>-Zellen nicht verlangsamt, sondern es kommt durch das Fehlen von Mx1 zu einer Beeinträchtigung



der Sekretion und zu einer deutlichen Reduktion sekretierter Proteine im apikalen Medium. Diese Ergebnisse stimmen mit der beschriebenen Reduktion im apikalen Transport nach einem Mx1-Knockdown überein (Hoff et al., 2014). Um zu überprüfen, ob die Anwesenheit von Mx1 die Assoziation von Kif5B mit apikalen Transportvesikeln begünstigt, wurden p75-GFP-positive Membranen aus MDCK $\Delta$ Mx1+p75-GFP- und MDCK $\Delta$ p75-GFP-Zellen aufgereinigt.



**Abb. 3.18. Mx1-Knockout beeinflusst die Sekretion von Gal3 und Clusterin/gp80**  
Abbildungsbearbeitung siehe nächste Seite.

**Abb. 3.18. Mx1-Knockout beeinflusst die Sekretion von Gal3 und Clusterin/gp80**

(A) MDCK- und MDCK $\Delta$ Mx1-Zellen wurden bis zu ihrer vollständigen Polarität auf Filtereinsätzen kultiviert. Die in das apikale (api) bzw. basolaterale (baso) Medium sekretierten Komponenten wurden für 4 h gesammelt. Die Menge an Gal3 in den Zelllysaten und im Medium wurde mittels Immunoblot durch die Verwendung eines Gal3-Antikörpers analysiert.  $\alpha$ -Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet, n=7. (B) Quantifizierung der Menge an sekretiertem Gal3 von MDCK- und MDCK $\Delta$ Mx1-Zellen aus Experimenten wie in A. Die Menge von apikal sekretiertem Gal3 wurde auf die Menge im Lysat normalisiert. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test, n=7. (C) Untersuchung der apikalen Sekretion von Clusterin/gp80, wie in A beschrieben, n=4. (D) Quantifizierung der Menge an sekretiertem Clusterin/gp80 von MDCK- und MDCK $\Delta$ Mx1-Zellen aus Experimenten wie in C. Die Menge von apikal sekretiertem Clusterin/gp80 wurde auf die Menge im Lysat normalisiert. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test, n=4. (E) Der apikale Transport von Gal3 wurde durch eine Sekretionskinetik untersucht. Apikale und basolaterale Medien von auf Filtereinsätzen kultivierten MDCK- und MDCK $\Delta$ Mx1-Zellen wurden nach 2, 4 und 6 h Sekretion gesammelt und im Immunoblot untersucht, n=3. (F) Quantifizierung der Menge von sekretiertem Gal3 von MDCK- und MDCK $\Delta$ Mx1-Zellen aus Experimenten wie in E. Die Menge von apikal sekretiertem Gal3 wurde auf die Menge im Lysat normalisiert. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test, n=3. (F) Aus MDCK $_{p75-GFP^-}$  und MDCK $\Delta$ Mx1 $_{p75-GFP^-}$ -Zellen wurden p75-GFP-Vesikel nach TGN-Exit immunpräzipitiert. Das Zelllysate, für die Dichtegradientenzentrifugation verwendetes Zellmaterial (Input), *Preclearing Beads* (PC) und die immunpräzipitierte Vesikel (V-IP) wurden im Western-Blot analysiert, n=4. (G) Quantifizierung der Menge des co-präzipitierten Kif5B assoziiert mit p75-GFP positiven Membranen aus Experimenten wie in G. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test, n=4. WT = MDCK-Zellen,  $\Delta$ Mx1 = MDCK $\Delta$ Mx1-Zellen, api=apikal, baso=basolateral, V-IP=Vesikel-Immunpräzipitation.

Dazu wurden Zellhomogenate (Input) durch Dichtegradientenzentrifugation fraktioniert und anschließend wurden die p75-GFP-positive Membranen mit Hilfe eines GFP-Antikörpers immunpräzipitiert. Ein vor der Isolierung durchgeführtes *Preclearing* (PC) ermöglichte es, einen geringen Teil unspezifisch bindender Proteine aus dem Zellhomogenat zu isolieren. Anschließend wurden die isolierten p75-GFP-Vesikel (V-IP) auf das Vorhandensein von Kif5B überprüft (Abb. 3.18. G). Die Analyse ergab, dass signifikant weniger Kif5B mit isolierten Vesikeln aus MDCK $\Delta$ Mx1 $_{p75-GFP^-}$ -Zellen im Vergleich zu MDCK $_{p75-GFP^-}$ -Zellen co-präzipitiert wurde (Abb. 3.18. H).

Es kann also davon ausgegangen werden, dass Mx1 auf post-TGN-Vesikeln in der Tat die Vesikel-Interaktion mit dem Motorprotein stabilisiert. Somit konnte zum ersten Mal die funktionelle Beteiligung von Mx1 im apikalen Proteintransport nachgewiesen und beschrieben werden.

**3.2.7. Untersuchung des Membran-Interaktionsmotivs der großen GTPase Mx1**

Alle bisherigen Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass Mx1 mit dynamischen Membranen interagiert, obwohl diese großen GTPasen keine PH-Domäne besitzen. Verantwortlich dafür ist eine Schleifenregion (Faelber et al., 2013). Dieser Bereich enthält ein Membran-Interaktionsmotiv, welches aus einer Ansammlung von vier positiv geladenen Lysinen besteht (Position für humanes MxA: 554-557, Position für canines Mx1: 549-552). Durch den Austausch einzelner Lysine zu Glutaminsäure an den Positionen 554-557 des humanen MxA kam es zur Beeinträchtigung der Lipidbindung (von der Malsburg et al., 2011). Denkbar ist, dass Mx-Proteine aufgrund ihrer Fähigkeit Membranen zu binden und umzuformen (Accola et al., 2002; Kochs et al., 2005, von der

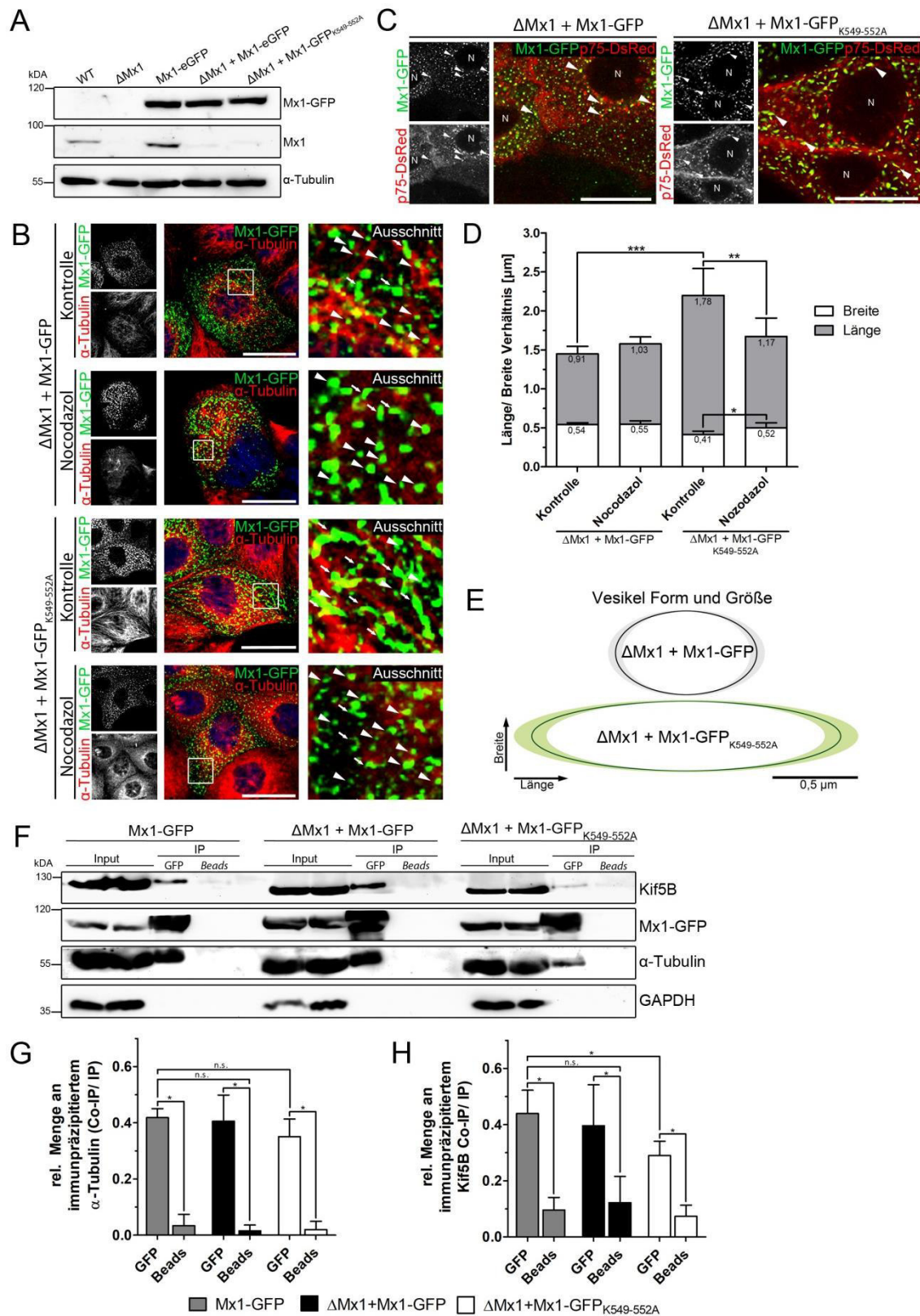
Malsburg, 2011), ähnlich wie Dynamin, an der Abschnürung von Transportvesikeln beteiligt sind. Daher sollte der Einfluss des Interaktionsmotivs von Mx1 für den intrazellulären Transport untersucht werden.

Dafür wurden die vier Lysine des Tetrapeptid-Motivs an der Position 549-552 im caninen Mx1 mutiert und jeweils durch ein Alanin ersetzt. Durch den Austausch zu Alanin wurde die Ladung des ursprünglich positiv-geladenen Interaktionsmotivs neutralisiert. Um die Auswirkung der Mutation zu untersuchen, wurde das mutierte Mx1 mit GFP fusioniert (Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>) und stabil in MDCK<sub>ΔMx1</sub>-Zellen transfiziert (MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP K549-552A</sub>). Als Kontrolle wurde eine stabile MDCK<sub>ΔMx1</sub>-Zelllinie erstellt, welche das Wildtyp-Mx1-Protein exprimiert (MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP</sub>). Die Expression der Konstrukte wurde im Immunoblot getestet (Abb. 3.19. A). Zum Vergleich dienten gleichzeitig Zelllysate von MDCK-, MDCK<sub>ΔMx1</sub>- und MDCK<sub>Mx1-GFP</sub>-Zellen. Durch Betrachtung der beiden Zelllinien MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP</sub> und MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP K549-552A</sub> im KLSM konnte beobachtet werden, dass Mx1, welches eine Mutation im Membran-Interaktionsmotiv trägt, immer noch an subzellulären Organellen lokalisiert war (Abb. 3.19. B und C). Daher sollte zunächst geklärt werden, ob es sich, trotz Assoziation von Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>, um funktionelle Kompartimente handelt.

Zur Untersuchung wurden MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP</sub>- und MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP K549-552A</sub>-Zellen transient mit einem Plasmid, das die genetische Information von p75-DsRed enthält, transfiziert. Die in Abb. 3.19. B dargestellte Aufnahme lebender MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP</sub>-Zellen im KLSM zeigt eine Reihe von Mx1-GFP-tragenden Strukturen, die im selben Kompartiment mit p75-DsRed vorkommen. Dieselbe Beobachtung konnte auch mit den Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>-positiven Strukturen gemacht werden, was dafür spricht, dass mutiertes Mx1 noch in der Lage ist, mit apikalen Transportstrukturen zu assoziieren. Allerdings wiesen die Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>-positiven Strukturen im Vergleich zu Mx1-GFP-haltigen Strukturen eine elongierte, tubuläre Morphologie auf (Abb. 3.19. C). Die Quantifizierung der Länge und Breite der Strukturen ergab, dass Kompartimente, die positiv für mutiertes Mx1 waren, eine durchschnittliche Länge von 1,78 µm aufweisen (Abb. 3.19. D). Damit sind sie fast um das doppelte länger als Mx1-GFP-positive Strukturen, die eine Länge von 0,91 µm aufweisen. Mit der gewonnenen Kenntnis, dass Mx1 mit dem Tubulin-Netzwerk assoziiert, sollte überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen intakten Mikrotubuli und der beobachteten Elongation der Strukturen zu beobachten ist.

Die Wirkung von Nocodazol ausnutzend, wurden Mikrotubuli depolymerisiert und anschließend konfokalmikroskopisch untersucht (Abb. 3.19. B). Die Depolymerisierung wurde durch eine Immunfärbung von α-Tubulin visualisiert. Die Strukturen erschienen nach Depolymerisierung der Mikrotubuli rundlicher und zeigten eine ähnliche

Morphologie wie Mx1-GFP-enthaltenden Strukturen. Tatsächlich ergab die Quantifizierung, dass die Vesikel-Länge der Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>-positiven Strukturen durch die Behandlung von Nocodazol signifikant reduziert werden konnte (Abb. 3.19. D).



**Abb. 3.19. Austausch der vier Lysine in der L4-Schleife von Mx1 zu Alanin führt zu einer veränderten Vesikel-Morphologie**

Abbildungsbeschriftung siehe nächste Seite.

**Abb. 3.19. Austausch der vier Lysine in der L4-Schleife von Mx1 zu Alanin führt zu einer veränderten Vesikel-Morphologie**

(A) MDCK-, MDCK<sub>ΔMx1</sub>, MDCK<sub>Mx1-GFP</sub>-, MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP</sub>- und MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP K549-552A</sub>-Zellen wurden lysiert und im Immunoblot auf die Expression von endogenem Mx1 und Mx1-GFP untersucht. α-Tubulin diente als Ladekontrolle. (B) MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP</sub>- und MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP K549-552A</sub>-Zellen wurden transient mit p75-DsRed transfiziert und lebend im KLSM analysiert. Die Pfeilköpfe markieren rundliche Mx1-GFP- und elongierte Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>-positive Strukturen, die mit p75-DsRed überlappen. Maßstab: 10 μm, N=Nukleus. (C) Unpolare MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP</sub>- und MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP K549-552A</sub>-Zellen wurden mit Nocodazol behandelt. DMSO diente als Kontrolle. Zellen wurden fixiert, gegen α-Tubulin (Alexa Fluor 647) immungefärbt und im KLSM analysiert. Die Pfeilköpfe markieren runde Strukturen, wohingegen längliche Strukturen mit Pfeilen markiert sind. Maßstab: 25 μm. (D) Messung der Vesikel-Länge und -Breite in DMSO und Nocodazol behandelten Zellen aus Experimenten wie in C. Die Daten der Kontrolle (MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP</sub>: 110 Vesikel und MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP K549-552A</sub>: 126 Vesikel) sowie der Nocodazol behandelten Zellen (MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP</sub>: 143 Vesikel und MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP K549-552A</sub>: 129 Vesikel) sind als Mittelwerte ± SD dargestellt. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test. (E) Schematische Darstellung der Form und durchschnittlichen Größe (schwarze bzw. dunkelgrüne Linie) von Mx1-GFP- und Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>-positiven Strukturen. SD ist in grau bzw. hellgrün dargestellt. Maßstab: 0,5 μm. (F) Für Co-Immunpräzipitationen wurden MDCK<sub>Mx1-GFP</sub>-, MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP</sub>- und MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP K549-552A</sub>-Zellen verwendet. Die Durchführung erfolgte wie in Figur XX beschrieben. Mx1, Kif5B und α-Tubulin wurden im Immunoblot detektiert. MDCK<sub>Mx1-GFP</sub>- und MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP</sub>-Zellen dienten als Positivkontrolle für die Interaktion von Mx1 mit Kif5B und α-Tubulin. GAPDH wurde als Negativkontrolle eingesetzt, n=3. (G)-(H) Quantifizierung der Ergebnisse aus Experimenten wie in F. Mx1-GFP und Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub> binden signifikante Mengen an α-Tubulin (G) und Kif5B (H) in polaren MDCK-Zellen. Allerdings bindet Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub> signifikant weniger Kif5B. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test, n=8. Aus Ringer et al., 2018.

Zur Veranschaulichung ist die Form und durchschnittliche Größe der Mx1-GFP- und Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>-positiven Strukturen in Abb. 3.19. E schematisch dargestellt.

Das Resultat lässt darauf schließen, dass die Morphologie und die subzelluläre Verteilung der Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>-positiven Strukturen abhängig von intakten Mikrotubuli und möglicherweise auch abhängig von der Anwesenheit des Motorproteins Kif5B sind. Dementsprechend entwickelte sich daraus die Hypothese, dass die Elongation der Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>-positiven Strukturen zum einen auf der Aktivität von Vesikel-assoziierten Motorproteinen beruht. Zum anderen könnte die Veränderung der Vesikel-Morphologie auf ein Defizit in der Vesikelabschnürung zurückzuführen sein.

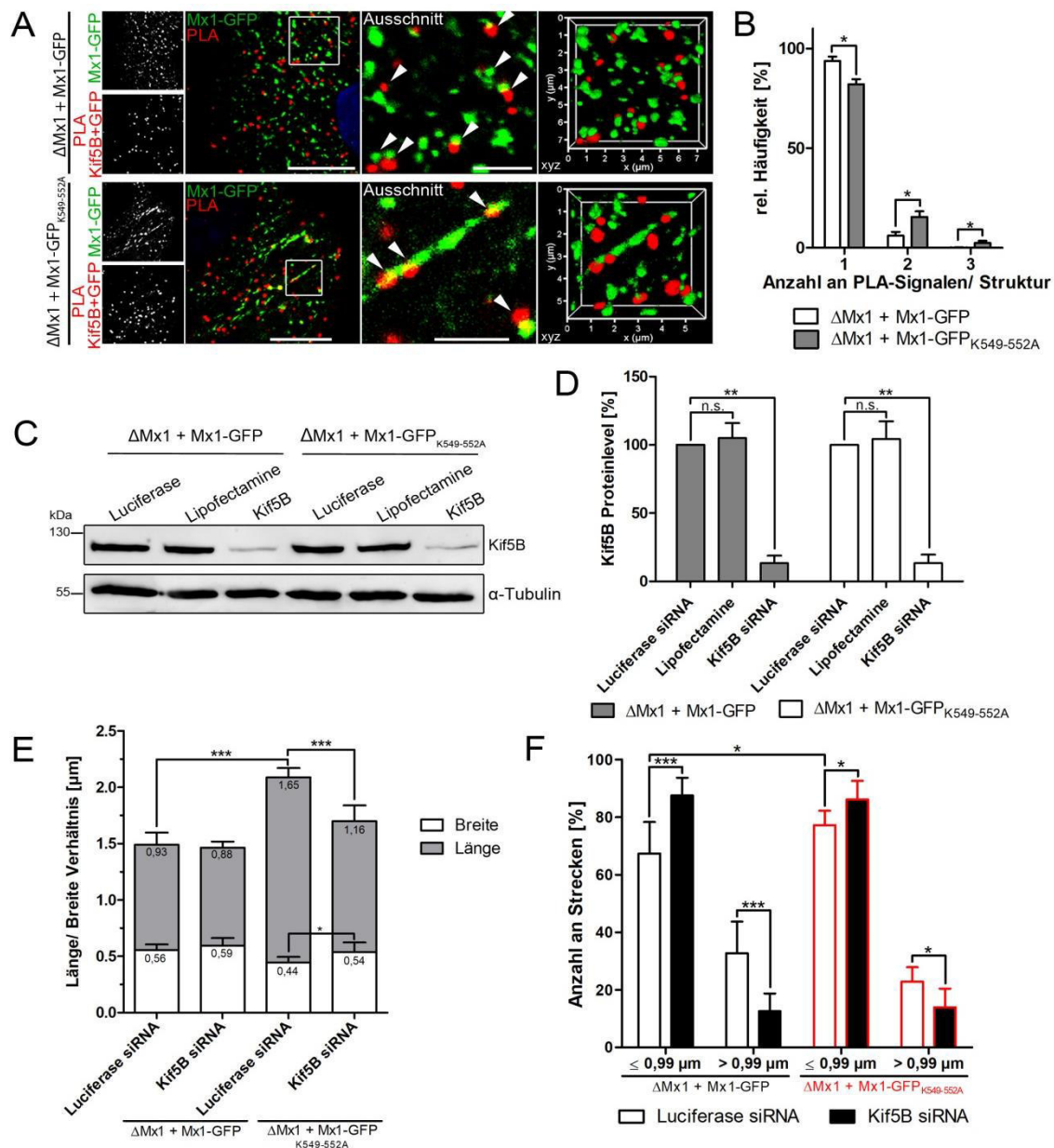
Um diese These zu evaluieren und um aufzuklären, ob Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub> trotz Mutation die Fähigkeit besitzt, mit Kif5B zu interagieren, wurde eine Interaktionsanalyse mittels Co-Immunpräzipitation durchgeführt. Dazu wurden polare MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP K549-552A</sub>-Zellen verwendet. Daraufhin wurden MDCK<sub>Mx1-GFP</sub> und MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP</sub>-Zellen als Positivkontrolle für die Assoziation von Mx1 mit Kif5B und α-Tubulin mitgeführt. Die Proteine wurden im Anschluss an die Co-Immunpräzipitation an eine SDS-PAGE über Immundetektion im Western Blot visualisiert (Abb. 3.19. F). Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, dass Mx1, das in der L4-Schleife mutiert war, trotzdem mit Kif5B sowie α-Tubulin assoziiert. GAPDH diente als Negativkontrolle, um auszuschließen, dass lösliche Proteine unspezifisch gebunden wurden. Allerdings konnte eine verminderte Interaktion von α-Tubulin mit Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub> im Vergleich zu Mx1-GFP beobachtet werden (Abb. 3.19. G). Außerdem wurden 25% weniger Kif5B-Proteine zusammen mit mutiertem Mx1 als mit dem Wildtyp-Protein angereichert (Abb. 3.19. H).

Die gewonnenen Kenntnisse über die Interaktion mit Kif5B stützen sich zudem auf PLA-Interaktionsanalysen mit polaren MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP</sub>- und MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP K549-552A</sub>-Zellen. Durch den PLA war es auch möglich, die Elongation der vesikulären Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>-positiven Strukturen abhängig von Kif5B visuell darzustellen (Abb. 3.20. A und Abb. 6.4). Die Analyse im KLSM zeigte Mx1-GFP-positive Vesikel, welche die bereits beschriebene punktförmige Morphologie aufwiesen. Die einzelnen PLA-Signale stellten die räumliche Nähe von Kif5B dar und überlappten hauptsächlich mit den runden Strukturen, die positiv für Mx1-GFP waren. Zur besseren Visualisierung und genaueren Betrachtung dieser Assoziationen wurden 3D-Aufnahmen angefertigt. Dies erlaubte die räumliche Darstellung der Lokalisation der PLA-Signale zusammen mit den Mx1-GFP-haltigen vesikulären Strukturen. Außerdem konnten auf diese Weise Assoziations-Ereignisse sichtbar gemacht werden, die sich außerhalb der Fokusebene befanden. Die 3D-Aufnahmen bestätigten, dass sich das Motorprotein Kif5B vor allem an den rundlichen Mx1-GFP-positiven Strukturen befindet. Im Gegensatz dazu offenbarte sich durch diese PLA-Analyse auch, dass sich mehrere Kif5B-Proteine vor allem in räumlicher Nähe zu den länglichen Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>-positiven Strukturen befinden (Abb. 3.20. B). Dies verdeutlichen insbesondere die 3D-Aufnahmen, die eindeutig die Anordnung mehrerer PLA-Signale entlang der länglichen Strukturen zeigen. Allerdings überlappen in den MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP K549-552A</sub>-Zellen wenige PLA-Ereignisse auch mit rundlichen Strukturen.

Vergleicht man die Präsenz von Kif5B auf Mx1-GFP- und Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>-positiven Vesikeln, so konnte festgestellt werden, dass signifikant mehr PLA-Signale an den elongierten Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>-positiven Anreicherungen detektiert wurden (Abb. 3.20. C). Dies lässt vermuten, dass sich an diesen Strukturen eine größere Zahl an Kinesin-Motorproteinen befindet als an den runden Mx1-GFP-positiven Strukturen. Dies verdeutlicht, dass die Elongation der Strukturen, die positiv für mutiertes Mx1 waren, möglicherweise durch die Aktivität der Motorproteine bedingt ist. Als weitere Kontrolle dienten Zellen, die ausschließlich mit der Transfektionsreagenz Lipofectamine inkubiert wurden (Abb. 3.20. D). Zusätzlich wurde die Effizienz des Kif5B-Knockdowns evaluiert. Die Quantifizierung zeigte, dass die siRNA gegen Kif5B eine signifikante Reduktion der Kif5B-Proteinmenge auf ca. 12,5% in beiden Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollzellen bedingte (Abb. 3.20. E).

Um tiefere Einblicke in die Dynamik der Mobilität der Vesikelpopulation von MDCK<sub>Mx1-GFP</sub>-, MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP</sub>- und MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP K549-552A</sub>-Zellen zu gewinnen und um das Fissions- und Fusionsverhalten der Membranstrukturen zu analysieren, wurde die Bewegung der Strukturen sowie die Fissions- und Fusionsereignisse quantitativ erfasst (Abb. 3.21.).



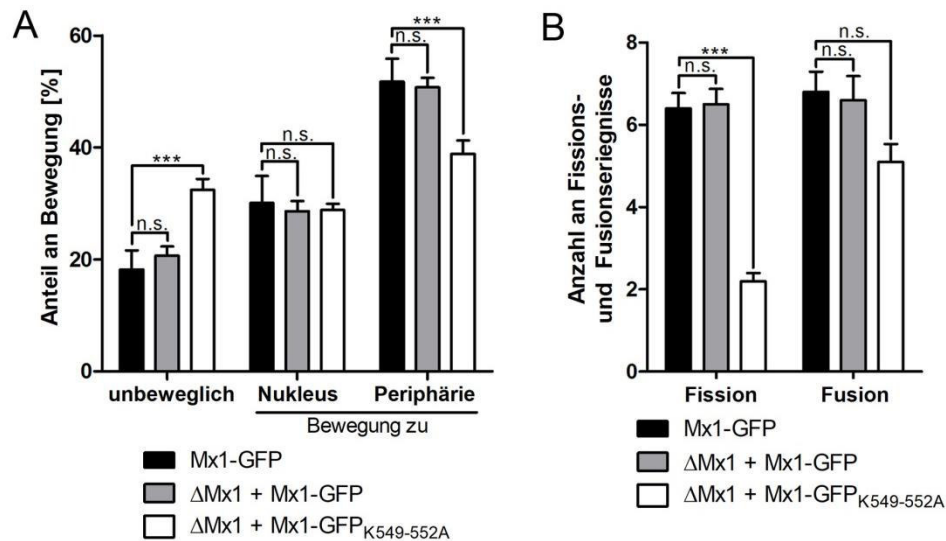


**Abb. 3.20. Mx1-GFP und Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub> befinden sich in räumlicher Nähe zu Kif5B**

(A) Durch die Verwendung von Primärantikörpern gegen GFP und Kif5B konnte die räumliche Nähe von Kif5B zu Mx1-GFP- und Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>-positiven Strukturen dargestellt werden (Pfeilköpfe). 3D-Aufnahmen sind auf der rechten Seite dargestellt (xyz). Maßstab: 10  $\mu$ m und 2,5  $\mu$ m. (B) Quantifizierung der PLA-Ereignisse aus Experimenten wie in A. Dargestellt ist die relative Häufigkeit von ein, zwei oder drei PLA-Signalen an Mx1-GFP-positiven Strukturen in MDCK $\Delta$ Mx1+Mx1-GFP- (n=30 Zellen) und MDCK $\Delta$ Mx1+Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>-Zellen (n=32 Zellen). Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test, n=3. (C) MDCK-Zellen wurden mit Kif5B-spezifischer siRNA transfiziert. Die Lysate der Kontrollzellen (Lipofectamine-Behandlung) und der mit Luciferase-siRNA sowie Kif5B-siRNA behandelten MDCK $\Delta$ Mx1+Mx1-GFP- und MDCK $\Delta$ Mx1+Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>-Zellen wurden auf den Kif5B-Proteingehalt mittels Immunoblot analysiert.  $\alpha$ -Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet, n=3. (D) Die Effizienz des Kif5B-Knockdowns konnte durch die Quantifizierung der Experimente aus C bestätigt werden. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test. (E) Vesikel-Länge und -Breite von Kontroll- und Kif5B depletierten (Kif5B siRNA) Zellen. Die Daten der Kontrolle (MDCK $\Delta$ Mx1+Mx1-GFP: 468 Vesikel und MDCK $\Delta$ Mx1+Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>: 504 Vesikel) sowie mit Kif5B-siRNA behandelten Zellen (MDCK $\Delta$ Mx1+Mx1-GFP: 460 Vesikel und MDCK $\Delta$ Mx1+Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>: 460 Vesikel) sind als Mittelwerte  $\pm$  SD dargestellt. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test, n=3. (F) Zur Untersuchung dynamischer Vorgänge dienten Kontroll- und Kif5B depletierte MDCK $\Delta$ Mx1+Mx1-GFP- und MDCK $\Delta$ Mx1+Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>-Zellen. Vesikel wurden über 400 Sekunden verfolgt. Ausgewertet wurden nur Vesikel, die länger als 189 Sekunden von der Software erkannt wurden. Für Kontrollzellen wurden 5821 (MDCK $\Delta$ Mx1+Mx1-GFP) und 7076 (MDCK $\Delta$ Mx1+Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>) Strukturen, für Kif5B depletierte Zellen 4676 (MDCK $\Delta$ Mx1+Mx1-GFP) und 7227 (MDCK $\Delta$ Mx1+Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>) Strukturen analysiert. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test, n=3. Aus Ringer et al., 2018.

Dabei wurde deutlich, dass ein größerer Anteil an Strukturen, die positiv für mutiertes Mx1 waren, unbeweglicher als Mx1-GFP-positive Strukturen war (Abb. 3.21. A). Die Mutation beeinflusst offenbar die anterograde Bewegung der Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>-Strukturen zur Zellperipherie. Der anterograde Transport ist zusammen mit dem retrograden Transport zum Zellkern, der hier scheinbar nicht beeinflusst zu sein scheint, essentiell für den intrazellulären und sekretorischen Transport. Das Ergebnis verdeutlicht, dass Mx1 zusammen mit dem Kif5B-Motorprotein funktionell im anterograden Transportgeschehen wirkt.

Für die dynamischen Vorgänge im Transport spielt vor die Fission- und Fusion von Vesikeln eine entscheidende Rolle. Eine dazu erstellte Studie konnte bereits zeigen, dass Mx1 einer hohen Fusions- und Fissionsdynamik unterliegt (Hoff et al., 2014).



**Abb. 3.21. Die Mutation im Membran-Interaktionsmotiv verändert das dynamische Verhalten von Mx1**  
**(A)** Quantifizierung der Mobilität von Mx1-GFP-positiven Strukturen in MDCK<sub>Mx1-GFP</sub> (1817 Vesikel, n=6 Zellen), MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP</sub> (1936 Vesikel, n=6 Zellen) sowie MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP K549-552A</sub>-Zellen (1889 Vesikel, n=6 Zellen). Strukturen, die länger als 190 Sekunden von der Software erkannt wurden, wurden in die Auswertung miteinbezogen, um die verlässlich die Richtung ihrer Bewegung zu bestimmen. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einer zweifaktoriellen ANOVA und Bonferroni-Post-Test.  
**(B)** Quantifizierung der Fissions- und Fusionsdynamik von Mx1-GFP-tragenden Strukturen in MDCK<sub>Mx1-GFP</sub> (n=3 Zellen), MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP</sub> (n=4 Zellen) sowie MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP K549-552A</sub>-Zellen (n=4 Zellen). Die Ereignisse wurden über einen Zeitrahmen von 100 Sekunden in einem Bereich von 10 μm x 10 μm erfasst. Für jede Zelllinie wurden zehn Bereiche analysiert. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test.

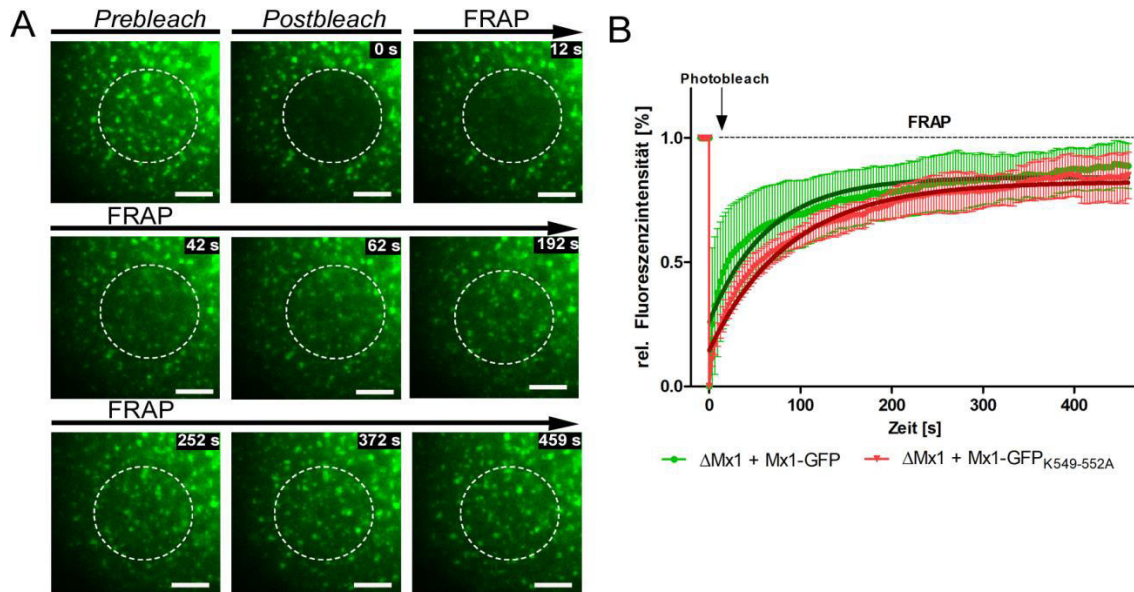
Dieses Verhalten ist nicht unerwartet, da Mx1 eine große GTPase der Dynamin-Großfamilie ist und strukturelle und funktionelle Eigenschaften zu den anderen Mitgliedern aufweist. Die Dynamik der Mx1-GFP-positiven Strukturen wird deutlich, wenn man die Anzahl der Fusions- und Fissionsereignisse betrachtet (Abb. 3.21. B). Die Gegenüberstellung von Mx1-GFP- und Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>-positiven Strukturen machte deutlich, dass letztere weniger Vesikelabschnürungen aufwiesen, was auf ein deutliches Defizit bei der Fission schließen lässt. Allerdings schienen die Fusionsereignisse von der Mutation in der L4-Schleife von Mx1 nicht signifikant beeinflusst worden zu sein.



Die hier gewonnenen Erkenntnisse unterstützen die These, dass die Mutation im Membran-Interaktionsmotiv von Mx1 ein Defizit in der Abschnürung von Transportvesikeln bewirken könnte. Gleichzeitig binden Kif5B-Motorproteine an Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>-tragenden Strukturen, deren Aktivität jedoch nicht beeinflusst ist, was letztendlich die Elongation der Strukturen bedingt.

### **3.2.8. Die Mutation im Membran-Interaktionsmotiv verändert das Verhalten von Mx1 und führt zu Veränderungen im apikalen Proteintransport**

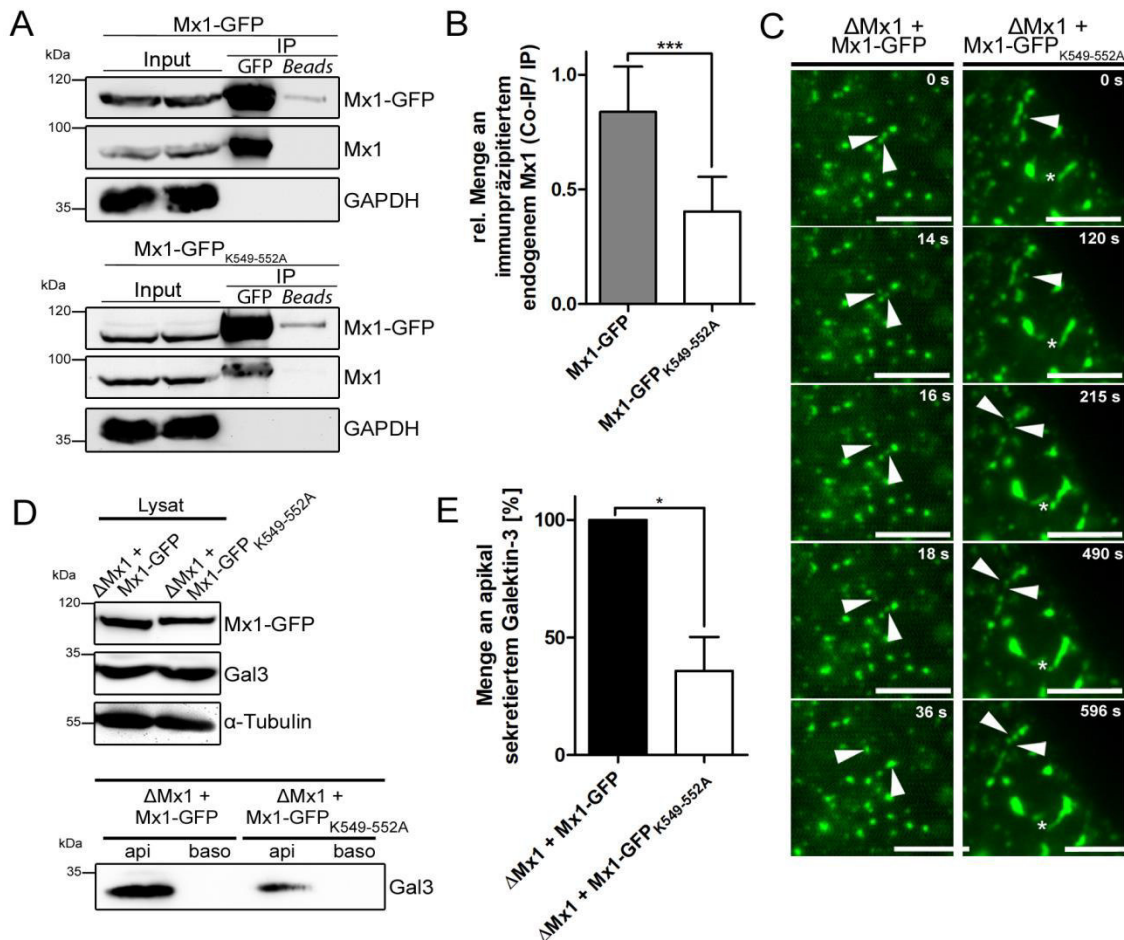
Als Nächstes stellte sich die Frage, welcher genaue molekulare Mechanismus den Defekt in der Abschnürung von Transportvesikeln bei der Mx1 Mutante verursacht. Zum einen könnte dieser Effekt durch die verminderte Membranbindungsfähigkeit von Mx1<sub>K549-552A</sub> entstehen, zum anderen könnte dabei auch eine Veränderung im Oligomerisierungs-Verhalten von Mx1<sub>K549-552A</sub> eine Rolle spielen. Zunächst wurde untersucht, ob die dynamische Assoziation und die Membranbindungseigenschaften durch die Mutation in der L4-Schleife beeinflusst werden. Dazu wurden FRAP-Analysen von Mx1-GFP und Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>, welche transient in COS-7-Zellen exprimiert wurden, durchgeführt. Damit ist es möglich die Kinetik der Bindung der beiden Proteine an zelluläre Membranen zu vergleichen. Die Durchführung und Auswertung erfolgte analog wie in Abb. 3.10. beschrieben. Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub> zeigt wie Mx1-GFP (Abb. 3.22. A) ein vesikuläres Muster, mit der Ausnahme, dass einige elongierte Strukturen zu beobachten sind. Das Ergebnis der Quantifizierung der FRAP-Analyse ist nach der Normalisierung in Abb. 3.22. B dargestellt. Es wird deutlich, dass die Erholung der Fluoreszenzintensität in dem gebleichten Areal in Zellen, die Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub> exprimieren, signifikant verzögert war. Im Gegensatz zu Mx1-GFP, das eine zweiphasige Erholung der Fluoreszenzintensität mit einem raschen und einem anschließenden langsameren Anstieg der Fluoreszenz zeigte (Abb. 3.10.), wies Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub> bereits zu Beginn eine verlangsamte Fluoreszenzerholung auf. Allerdings konnte ein ähnlich hoher Sättigungswert im Bleichfeld erreicht werden, auch wenn dieser erst nach ungefähr 300 Sekunden erreicht wurde. Die Halbwertszeit  $\tau_{1/2}$  von Mx1-GFP beträgt 44,27 Sekunden. Die verzögerte Fluoreszenzerholung wird durch die Halbwertszeit  $\tau_{1/2}$  von Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub> mit einer Dauer von 61,15 Sekunden verdeutlicht. Jenes Ergebnis bestätigt, dass die Bindungskinetik durch die Mutation im Membran-Interaktionsmotiv von Mx1 beeinträchtigt wird und es untermauert die beschriebene Rolle der L4-Schleife in der Bindung von Membranen (von der Malsburg et al., 2011).



**Abb. 3.22. Die Mutation im Membran-Interaktionsmotiv von Mx1 führt zu Veränderungen in der Membranbindung**

**(A)** Mikroskopische Zeitreihe der FRAP Analyse durchgeführt in COS-7-Zellen transfiziert mit Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>. Gemessen wurde die Intensität des gebleichten Areals (gestrichelter Kreis). Die Fluoreszenzenerholung wurde über einen Zeitraum von 460 Sekunden aufgenommen. *Prebleach*: Zeitpunkt vor dem Bleichen (20 Aufnahmen mit einer zeitlichen Auflösung von 0,5 s); *Postbleach*: Zeitpunkt unmittelbar nach dem Bleichen; *FRAP*: Messung der Fluoreszenzenerholung (155 Aufnahmen mit einer zeitlichen Auflösung von 3 s). Maßstab: 5  $\mu$ m. **(B)** Qualitative Analyse der FRAP-Daten. Die Daten für die Fluoreszenzenerholung von Mx1-GFP stammen aus Abb. 3.10. Die Fluoreszenzintensität wurde mit der Leica LAS X Software über die Zeit quantifiziert (n=5). Anschließend wurde eine Doppel- und eine *full-scale*-Normalisierung durchgeführt. Mit GraphPad Prism wurde die Regenerationszeit der Fluoreszenzzunahme von Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub> (Halbwertszeit  $\tau_{1/2}$ =61,61 s) berechnet. Der Zeitpunkt 0 s zeigt den Punkt an dem der Bleichpuls gesetzt wurde und die Fluoreszenzregeneration startet.

Allerdings wurde durch vorherige Studien auch vorgeschlagen, dass neben dem Membranbindungsdefekt nach Austausch der vier Lysine zu Glutaminsäure eine veränderte Selbstassemblierung von Mx1 in Anwesenheit von GTP $\gamma$ S zu beobachten ist (Reichert et al., 2004; von der Malsburg et al., 2011). Daher sollte ermittelt werden, ob die Basenaustauschmutation von Lysin zu Alanin das Oligomerisierungs-Verhalten ebenfalls beeinflusst. Um dies zu erforschen, wurden Co-Immunpräzipitationen mit MDCK<sub>Mx1-GFP</sub>- und MDCK<sub>Mx1-GFP K549-552A</sub>-Zellen durchgeführt (Abb. 3.23. A). Dabei wurde die Tatsache ausgenutzt, dass Mx1-GFP eine größere Molekülmasse als endogenes Mx1 besitzt. Außerdem ist die Fähigkeit zur Homo-Oligomerisierung von Mx1-GFP, wie bereits beschrieben, unbeeinträchtigt. Bei der quantitativen Bestimmung der Menge an angereichertem endogenem Mx1 in Bezug auf präzipitiertes Mx1-GFP bzw. Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub> konnte eine signifikante Reduzierung der Mx1-Proteinmenge um ca. 50% verzeichnet werden (Abb. 3.23. B). Allerdings war die Fähigkeit von Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub> zur Selbstassemblierung nicht vollständig beeinträchtigt. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass durch den Austausch der Lysine in der L4-Schleife zu Alanin nicht nur die Membranbindung sondern auch das Oligomerisierungs-Verhalten beeinflusst wird.



**Abb. 3.23. Die Mutation im Membran-Interaktionsmotiv von Mx1 führt zu Veränderungen in der Mx1-Assemblierung und dem apikalen Proteintransport**

(A) Die Assemblierungskinetik von Mx1 Oligomeren wurde mittels Co-Immunpräzipitationen mit MDCK<sub>Mx1-GFP</sub>- und MDCK<sub>Mx1-GFP<sup>K549-552A</sup></sub>-Zellen analysiert. Die Immunpräzipitation von Mx1-GFP und Mx1-GFP<sup>K549-552A</sup> wurden erfolgte mit GFP-Nanobody-Trap Beads. GAPDH diente als Negativkontrolle, n=9. (B) Quantifizierung der Ergebnisse wie aus Experimenten in C. Die Menge an co-präzipitiertem endogenem Mx1 mit Mx1-GFP<sup>K549-552A</sup> ist signifikant reduziert als mit Mx1-GFP. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test, n=9. (C) Mikroskopische Zeitreihe von unpolaren MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP</sub>- und MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP<sup>K549-552A</sup></sub>-Zellen. Die Pfeilköpfe markieren Fissions-Ereignisse. Der Stern zeigt ein sich verlängerndes Mx1-GFP<sup>K549-552A</sup>-positives Kompartiment. Maßstab: 5 μm. (D) MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP</sub>- und MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP<sup>K549-552A</sup></sub>-Zellen wurden bis zu ihrer vollständigen Polarität auf Filtereinsätzen kultiviert. Die in das apikale (api) bzw. basolaterale (baso) Medium sekretieren Komponenten wurden für 4 h gesammelt. Die Menge an Gal3 in den Zelllysaten und im Medium wurde mittels Immunoblot durch die Verwendung eines Gal3-Antikörpers analysiert. α-Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet, n=3. (E) Quantifizierung der Menge an sekretiertem Gal3 aus Experimenten wie in D. Die Menge von apikal sekretiertem Gal3 wurde auf die Menge im Lysat normalisiert. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test, n=3.

Aus diesem Grund sollte die Dauer von Fissions- und Fusionsereignissen in MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP<sup>K549-552A</sup></sub>-Zellen visuell mit Hilfe der Lebendzellmikroskopie dargestellt werden. Wie in Abb. 3.23. C an den angegebenen Zeitwerten deutlich zu erkennen ist, zeigten die elongierten Mx1-GFP<sup>K549-552A</sup>-tragenden Strukturen eine höhere Zeitdauer für dynamische Ereignisse. Mx1-GFP-positive Kompartimente zeigten währenddessen mehrere dynamische Prozesse innerhalb weniger Sekunden. Faszinierenderweise konnte im Gegensatz dazu für Mx1-GFP<sup>K549-552A</sup>-positive Strukturen erst nach 120 Sekunden ein eindeutiges Abknospungsereignis beobachtet werden. Zusätzlich

konnte durch die Aufnahme lebender Zellen die direkte Elongation eines Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>-tragenden Kompartiments (durch ein Sternchen in Abb. 3.23. C markiert) aufgenommen werden.

Um in diesem Zusammenhang die Bedeutung des Membran-Interaktionsmotivs in der apikalen Sekretion zu untersuchen und um aufzuklären, ob deren Mutation direkt mit einer verminderten Sekretion einhergeht, wurde eine Sekretionsanalyse durchgeführt. Dafür wurde das Kulturmedium, von auf Filtereinsätzen kultivierten MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP</sub>- und MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP K549-552A</sub>-Zellen, gesammelt und mittels Immunoblot analysiert (Abb. 3.23. D). Die Quantifizierung der Ergebnisse zeigt eine signifikante Abnahme der Menge auf nur mehr 40% an apikal sekretiertem Gal3 (Abb. 3.23. E). Dies spricht dafür, dass die Sekretion apikal transportierter Proteine auf das einwandfreie Funktionieren des vesikulären Transports angewiesen ist. Das Resultat verdeutlicht, dass durch die defekte Vesikelabknospung durch Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub> weniger apikale Proteine sekretiert werden können.

## 4. Diskussion

### 4.1. Die Detyrosinierung beeinflusst die Zellpolarisierung, die Zellmigration und die Zelladhäsion

Mikrotubuli sind entscheidend für die Entstehung und Aufrechterhaltung der zellulären Polarität. Eine für die Zellpolarisierung und den apikalen Proteintransport wichtige Modifikation betrifft die Tyrosinierung bzw. Detyrosinierung (Quinones et al., 2011; Zink et al., 2012). Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung dieser Tubulin-Modifikation im Prozess der Polarisierung von Epithelzellen besser zu verstehen.

Neben der Ausbildung der Zellpolarität ist das Mikrotubuli-Zytoskelett auch für die zelluläre Adhäsion und die Zellmigration von entscheidender Bedeutung. Fokale Adhäsionen sind für den Prozess der Migration unverzichtbar, denn mit Hilfe dieser Strukturen werden die mechanischen Kräfte auf die darunterliegende Matrix übertragen. Für die Bildung sowie Auflösung solcher Fokaladhäsionen am vorderen bzw. hinteren Teil der Zelle sind unterschiedliche, aber koordinierte Mechanismen notwendig. Dynamische Mikrotubuli spielen eine wichtige, regulierende Rolle in der Dynamik dieser Strukturen. Gleichzeitig sind sowohl die Orientierung der Mikrotubuli als auch die asymmetrische Regulation der Mikrotubuli-Dynamik und deren krafterzeugende Eigenschaft für den Migrationsprozess entscheidend. Auch bei diesen Prozessen scheinen posttranslationale Modifikationen der Tubulin-Untereinheiten von wichtiger Bedeutung zu sein (Etienne-Manneville, 2004, Stehbens & Wittmann, 2012; Etienne-Manneville, 2013). Im ersten Teil der Diskussion werden daher zunächst die in Kapitel 3.1 beschriebenen Ergebnisse dargestellt und erörtert.

#### 4.1.1. Die Detyrosinierung beeinflusst die Form der Zellen sowie die Zellpolarität

Das Interesse an posttranslationalen Tubulin-Modifikationen und das Verständnis über deren Funktionen hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Allerdings wirft diese Thematik noch einige unbeantwortete Fragen auf. Im Zusammenhang mit der zellulären Polarität konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Tyrosinierung/Detyrosinierung um eine entscheidende PTM für die Aufrechterhaltung der epithelialen Integrität und den apikalen Transport handelt (Zink et al., 2012; Janke & Bulinski, 2011; Zink & Jacob, 2015). In zwei verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass sich die Zusammensetzung und die Verteilung der Mikrotubuli und ihrer Modifikationen im Verlauf der Polarisierung dramatisch verändern. MDCK-Zellen weisen bis zur Ausbildung der Polarität eine stetig ansteigende TTL-Expression auf. Gleichzeitig sinkt die Menge an detyrosiniertem Tubulin während der Polarisierung deutlich. Nach Erreichen der Polarität kommt es zu einem Abfall des TTL-Gehalts (Zink et al., 2012) und zu einem Anstieg an acetyliertem Tubulin (Quinones et al., 2011). Dies sind eindeutige Hinweise dafür, dass

detyrosiniertes Tubulin und die damit verbundenen Einflüsse auf die Mikrotubuli bzw. Interaktionen mit Motorproteinen eine wichtige Rolle in der Polarisierung spielen (Zink et al., 2012). Die morphologischen Beobachtungen nach Überexpression der TTL konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. So zeigten TTL-überexprimierende Zellen die beschriebene, charakteristische Inselbildung mit hochgestreckten Zellen, die einen geringen Durchmesser besaßen. Der dramatische Verlust an detyrosiniertem Tubulin führte außerdem dazu, dass die Zellen eine vorzeitige polare Architektur aufwiesen (s. Abb. 3.1. und Abb. 3.2.). Besonders interessant ist, dass durch einen *Knockout* der TTL und die damit einhergehende Erhöhung des detyrosinierten Tubulin-Gehalts ein gegenteiliger Effekt erzielt werden konnte. Die Detyrosinierung bewirkte sowohl eine veränderte Zellmorphologie, die sich in deutlich flacheren, ausgedehnten Zellen äußerte, als auch eine beschleunigte Ausbildung der Zellmonoschicht. Die MDCK<sub>ΔTTL</sub>-Zellen zeigten zudem einen verlangsamten Polarisationsfortschritt. Dies deutet daraufhin, dass eine regulierte Aktivität der TTL ein wichtiger Faktor für die Morphogenese von Epithelzellen ist. Die morphologischen Unterschiede zwischen MDCK<sub>ΔTTL</sub>- und MDCK<sub>TTL-GFP</sub>-Zellen machen deutlich, dass vor allem die Detyrosinierung für die Ausbildung der korrekten Zellmorphologie und die Entstehung einer epithelialen Zellschicht unabdingbar ist (Zink et al., 2012).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit kamen Chang und Kollegen in ihren Studien zum gleichen Ergebnis. Sie konnten zeigen, dass durch Inhibierung der Detyrosinierung die morphologische Differenzierung von Myoblasten blockiert wird (Chang et al., 2002). Morphologische Veränderungen konnten auch in Fibroblasten aus TTL-*Knockout* (TTL<sup>-/-</sup>) Mäusen festgestellt werden. Diese zeigten aufgrund der erhöhten Menge an detyrosiniertem Tubulin eine weniger ausgeprägte Zellpolarität (Peris et al., 2006). Die fehlerfreie Regulation des Tyrosinierungs/Detyrosinierungs-Zyklus hat einen entscheidenden Einfluss auf die neuronale Entwicklung und Organisation. Die physiologische Bedeutung von TTL wurde unter anderem in TTL<sup>-/-</sup> Mäusen untersucht. Diese Tiere wiesen in post-mitotischen Zellen kein tyrosiniertes  $\alpha$ -Tubulin auf und starben in einem perinatalen Stadium wegen neuronaler Abnormalitäten und Fehlbildungen (Erck et al., 2005; Marcos et al., 2009).

Die in dieser Arbeit und die in der Literatur beschriebenen Veränderungen der Morphologie verdeutlichen, dass eine dynamische Anpassung von detyrosinierten und tyrosinierten Mikrotubuli für die Differenzierung der Zellen äußerst wichtig ist. Folglich ist die regulierte Expression der TTL und damit ein regulierter Tyrosinierungs/Detyrosinierungs-Zyklus unabdingbar. Dabei führen Veränderungen in diesem Zyklus zur Störung des Polarisationsprozesses und können sogar die Tumorgenese (Hammond et al., 2008) und die Tumor-Aggressivität beeinflussen (Lafanechere et al., 1998).

(s. Kapitel 4.1.2). Einige Arbeiten aus der Literatur geben auch Hinweise darauf, dass der Anstieg von detyrosiniertem Tubulin bzw. ein verändertes Expressionslevel der TTL mit bestimmten Pathomechanismen assoziiert ist (Zink & Jacob, 2015). Der Verlust der TTL und ein damit einhergehendes erhöhtes Level an Detyrosinierung induziert die EMT (Epithelial-mesenchymale Transition) in Brustkrebszellen. Morphologische Veränderungen erhöhen dabei das Metastasierungspotential, denn die Zellen zeigen eine erhöhte Fähigkeit der Wiederanheftung (Whipple et al., 2010).

Sehr wahrscheinlich ist auch, dass der Proteintransport durch die Tubulin-Modifikationen beeinflusst wird. Es konnte beobachtet werden, dass die Überexpression von TTL zu einem verlangsamten Transport zur apikalen Domäne in MDCK-Zellen führt, während basolaterale Transportprozesse davon nicht beeinflusst sind. Dies spricht dafür, dass detyrosinierte Mikrotubuli als Wegweiser für den gerichteten, apikalen Transport dienen (Lin et al., 2002; Zink et al., 2012). Vor allem während der Polarisierung benötigt der Transport von Vesikeln oder Organellen eine definierte Motorprotein-Aktivität, die durch eine Reihe von unterschiedlichen Faktoren, darunter auch PTMs, gesteuert wird. Als entscheidend hierfür hat sich vor allem die Detyrosinierung und die Acetylierung herausgestellt (Schatten & Sun, 2014).

Erstaunlicherweise veränderte sich nach dem *TTL-Knockout* auch der Gehalt an acetyliertem Tubulin (s. Abb. 3.1.). Möglicherweise treten vor allem die detyrosinierten Mikrotubuli-Stränge aufgrund ihrer Stabilität und Lebensdauer vermehrt mit der  $\alpha$ -Tubulin Acetyltransferase  $\alpha$ TAT1 in Kontakt. Dies könnte zu einem vermehrten Aufkommen von acetyliertem Tubulin in MDCK <sub>$\Delta$ TTL</sub>-Zellen führen. Die Detyrosinierung und Acetylierung sind hauptsächlich in stabilen Mikrotubuli zu finden. Diese langlebigen MTs zeichnen sich durch eine Resistenz gegen das Mikrotubuli-depolymerisierende Reagenz Nocodazol aus. Daher wurde zunächst angenommen, dass die Detyrosinierung selbst den Mikrotubuli die Stabilität verleiht (Schulze et al., 1987). Allerdings ist heute mit Sicherheit bekannt, dass die Modifikation die Stabilität nicht direkt bewirkt. Vielmehr ist die Stabilität eine Konsequenz der Detyrosinierung (Khawaja et al., 1988). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Modulation der TTL-Expression die Stabilität der Mikrotubuli verändert. Quantitative Analysen der MT-Dynamik ergaben, dass der Anstieg an detyrosiniertem Tubulin eine höhere MT-Stabilität hervorruft (s. Abb. 3.3.). In den MDCK <sub>$\Delta$ TTL</sub>-Zellen konnten signifikant weniger Depolymerisations-Ereignisse als in den MDCK-Zellen beobachtet werden. Dies spricht dafür, dass detyrosinierte Mikrotubuli weniger häufig schrumpfen oder ein Katastrophe-Ereignis auftritt. Die wichtigste Beobachtung war die signifikante Reduzierung der Polymerisations- und Depolymerisationsgeschwindigkeit der Mikrotubuli in den TTL-depletierten Zellen. Demnach bewirkt die gesteigerte Detyrosinierung in den MDCK <sub>$\Delta$ TTL</sub>-Zellen die

Stabilisierung der Mikrotubuli. Hingegen konnten in den MDCK<sub>TTL-GFP</sub>-Zellen nach Nocodazol-Behandlung kaum stabile Mikrotubuli beobachtet werden (Zink et al., 2012). Diese Ergebnisse stimmen mit der Ansicht überein, dass detyrosinierte Mikrotubuli eine höhere Stabilität aufweisen (Gundersen et al., 1984; Kreis, 1987; Wehland & Weber, 1987). Allerdings war die ermittelte durchschnittliche MT-Wachstumsgeschwindigkeit niedriger als die in der Literatur beschriebenen Werte. In den publizierten Arbeiten konnten Polymerisationsprozesse mit Geschwindigkeiten von 12,9 µm/min (Alieva et al., 2010) und 17,9 µm/min (Salaycik et al., 2005) beobachtet werden. Die niedrigeren Polymerisations- und Depolymerisationsgeschwindigkeiten in dieser Arbeit könnten methodisch bedingt sein. Denn die Expression von Tubulin-mCherry kann das Gleichgewicht der gesamten Tubulin-Menge verändern und sich negativ auf die Dynamik auswirken. Daher könnte alternativ zu dieser Analyse die Mikrotubuli-bindende Domäne von MAPs mit GFP fusioniert und in den Zellen exprimiert werden. Auf diese Weise können Mikrotubuli ohne Veränderungen der Tubulin-Menge visualisiert und analysiert werden.

#### **4.1.2. Die Detyrosinierung beeinflusst die Zellmigration und die Dynamik fokaler Adhäsionen**

Wie posttranslationale Tubulin-Modifikationen den Prozess der Migration oder den Aufbau und Abbau von fokalen Adhäsionen beeinflussen ist nicht genau bekannt und daher von großem Interesse. In dieser Arbeit konnte durch Manipulation der TTL-Expression der Einfluss der Detyrosinierung auf das Migrationsverhalten von MDCK-Zellen untersucht werden. Die Verschiebung des Tubulin-Gehalts in Richtung detyrosinierte Mikrotubuli führte zu einer schnelleren Migrationsgeschwindigkeit. Im Gegensatz dazu bewirkte der Verlust von detyrosinierten Mikrotubuli eine reduzierte Migrationsgeschwindigkeit (s. Abb. 3.4.).

Ähnliche Beobachtungen konnten durch die Modulation von VASH2 gemacht werden. Die Überexpression von VASH2, ein Enzym, welches das C-terminale Tyrosin von α-Tubulin entfernt, bewirkt genau wie der *Knockout* der TTL, einen Anstieg des detyrosinierten Tubulin-Gehalts. In Übereinstimmung mit den Daten dieser Arbeit konnten Iida-Norita und Kollegen beobachten, dass die VASH2-Überexpression in humanen Pankreas-Krebszellen eine stark gesteigerte Migration der Zellen bedingt. Im Gegensatz dazu bewirkt der *Knockdown* von VASH2 eine Reduktion der Zellmigration (Iida-Norita et al., 2019). Folglich scheint die Erhöhung der detyr-Tubulin Menge, verursacht entweder durch den *Knockout* der TTL oder durch die Überexpression von VASH2, die Zellmigration zu beeinflussen (s. Abb. 3.4. und Iida-Norita et al., 2019).



Das Wissen über die Rolle der Tubulin-Modifikationen und deren Einfluss auf die Entstehung bestimmter Pathomechanismen ist besonders wichtig. Die EMT spielt eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression und Metastasierung. Der Prozess, bei dem die Zellen ihre Polarität verlieren und es zur epithelialen Dedifferenzierung kommt, wird von einer unterdrückten TTL-Expression begleitet (Whipple et al., 2013). In weiterführenden Studien mit dem Vashabin-Protein konnte gezeigt werden, dass VASH2 die EMT in verschiedenen Krebszellen fördert. Die EMT ist allerdings nicht die Hauptursache der VASH2-vermittelten Metastasierung, vielmehr sind die Mikrotubuli Modifikation kritisch für die Metastasierung (Iida-Norita et al., 2019). Möglicherweise ist die Expression der TTL ein entscheidender Regulationsmechanismus, um die Detyrosinierung auf einem physiologischen Level zu halten und ein Gleichgewicht zwischen detyrosiniertem und tyrosiniertem Tubulin aufrechtzuerhalten. Auf diese Weise werden konstant hohe Mengen an detyrosinierten Mikrotubuli verhindert, was wiederum das Metastasierungspotential von Tumoren verringert (Zink et al., 2012; Iida-Norita et al., 2019). Aus diesem Grund wird die TTL auch als Tumorsuppressor angesehen (Lafanechere et al., 1998; Zink & Jacob, 2015).

Bei der Zellmigration spielt die Orientierung der Mikrotubuli eine wichtige Rolle. So sind detyrosinierte Mikrotubuli hauptsächlich in die Richtung der Migration ausgerichtet (Gundersen & Bulinski, 1988). Besonders interessant ist, dass diese asymmetrische Verteilung der detyrosinierten Mikrotubuli auch an der tumorinvasiven Zellfront (Whipple et al., 2010) und bei der Migration der MDCK- und MDCK<sub>ΔTTL</sub>-Zellen beobachtet werden konnte (s. Abb. 3.5.). Vor allem die MDCK<sub>ΔTTL</sub>-Zellen bildeten ein ausgeprägtes Netzwerk aus detyrosinierten Mikrotubuli an der Grenzfläche zum Wundareal aus. Des Weiteren zeichneten sich die TTL-Knockout Zellen durch eine Vielzahl von Pionier-Mikrotubuli sowie durch ausgeprägte Lamellipodien, welche für die gerichtete Zellmigration wichtig sind (Small et al., 2002), aus. Bei den Pionier-Mikrotubuli handelt es sich um stabilisierte Mikrotubuli, die durch eine reduzierte dynamische Instabilität charakterisiert sind (Wittmann et al., 2003). Die Orientierung wird dabei durch das Formin mDia vermittelt (Palazzo et al., 2001).

In den TTL-überexprimierenden Zellen konnte im Vergleich zu den MDCK<sub>ΔTTL</sub>-Zellen Gegenteiliges beobachtet werden (s. Abb. 3.5.). Diese hochgestreckten Zellen, die einen Mangel an detyrosiniertem Tubulin aufwiesen, bildeten weder Lamellipodien mit erkennbaren Pionier-Mikrotubuli noch ein ausgeprägtes Netzwerk aus detyrosinierten Mikrotubuli aus. Mikrotubuli sind entscheidend für die regulierte Bildung und die Dynamik von Lamellipodien. Als möglicher Grund wird hier die Bereitstellung von neuem Material am vorderen Ende der Zelle mit Hilfe der Mikrotubuli genannt. Mikrotubuli fördern auf diese Weise die Bildung des Lamellipodiums (Bretscher & Aguado-Velasco, 1998; Small

et al., 2002). Insbesondere die Detyrosinierung könnte den Transport von neuem Membranmaterial und damit die Bildung des Lamellipodiums verstärken, da Motorproteine mit einer höheren Affinität an detyrosinierte Mikrotubuli binden (Magiera & Janke, 2014). Die asymmetrische Anordnung der detyrosinierten Mikrotubuli und die Ausbildung des Lamellipodiums könnten die Erklärung für die gesteigerte bzw. verminderte Migrationsgeschwindigkeit in den MDCK<sub>ΔTTL</sub>-Zellen bzw. MDCK<sub>TTL-GFP</sub>-Zellen sein.

Eine andere, wichtige posttranslationale Modifikation für die Zellmigration stellt die Acetylierung dar. In Astrozyten führt die reduzierte Expression der  $\alpha$ -Tubulin Acetyltransferase  $\alpha$ TAT1 zu einer verlangsamten Zellmigration. In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass die Acetylierung einen erheblichen Einfluss auf die Dynamik von fokalen Adhäsionen hat. Es wird angenommen, dass  $\alpha$ TAT1 und damit die Acetylierung spezifisch die Anzahl, Verteilung und Dynamik von fokalen Adhäsionen kontrolliert (Bance et al., 2019). Die regulierte Bildung sowie Auflösung von Fokaladhäsionen ist entscheidend für die gerichtete Zellmigration. Bereits zahlreiche Studien belegen, dass die Dynamik dieser Strukturen durch Mikrotubuli reguliert wird (Etienne-Manneville, 2004). Dabei führt der mehrfache Kontakt zwischen den Anheftungsstrukturen und den Mikrotubuli zur Auflösung der fokalen Adhäsionen (Kaverina et al., 1999). Vor Kurzem konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Mikrotubuli vermutlich mit Hilfe des Adapterproteins Kank1 vermittelt wird. Dieses interagiert wiederum mit Talin, einer Hauptkomponente der fokalen Adhäsionen (Bouchet et al., 2016). Versuche mit MT-Inhibitoren machten deutlich, dass die Nocodazol-induzierte Depolymerisierung der Mikrotubuli die Ausbildung von Zellkontakten fördert und stabilisiert (Ezratty et al., 2005). Das Mikrotubuli-stabilisierende Agens Taxol führte indessen zur Vergrößerung der fokalen Adhäsionen (Kaverina et al., 1999). Der mehrmalige Kontakt zwischen Mikrotubuli und den Fokaladhäsionen ist für deren Auflösung entscheidend. Folglich ist das alternierende Wachsen und Schrumpfen der Mikrotubuli für deren regulierende Eigenschaft entscheidend. Ähnlich wie nach Taxol-Behandlung (Kaverina et al., 1999) zeigten TTL-*Knockout* Zellen größere Adhäsionsstrukturen (s. Abb. 3.6. und Abb. 6.2.). Außerdem konnten in diesen Zellen signifikant mehr fokale Adhäsionen beobachtet werden. Diese Veränderung in der Dynamik der Fokaladhäsionen könnte auf die vermehrte Detyrosinierung und die erhöhte MT-Stabilität in diesen Zellen zurückzuführen sein. In TTL-überexprimierenden Zellen konnten im Gegensatz zu den MDCK- und MDCK<sub>ΔTTL</sub>-Zellen nur wenige, kleine Fokalstrukturen beobachtet werden (s. Abb. 3.6. und Abb. 6.2.). Dies lässt vermuten, dass die Assemblierungskinetik der fokalen Adhäsionen durch die Detyrosinierung bzw. Tyrosinierung verändert werden kann.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass sich vor allem detyrosinierte Mikrotubuli in unmittelbarer Nähe zu Vinculin-positiven Adhäsionen befinden. Erstaunlicherweise konnte dies für Paxillin-positive Adhäsionen nicht bestätigt werden (s. Abb. 3.8.). Möglicherweise ist der hier eingesetzte *Proximity Ligation Assay* durch den Einsatz von Antikörpern limitiert. Aufgrund der komplexen, dreidimensionalen Struktur der fokalen Adhäsionen kann die Bindung der Zielproteine durch sterische Behinderung wahrscheinlich nur bedingt stattfinden. Daher bleibt offen, ob detyrosiniertes Tubulin auch mit Paxillin assoziiert und ob es sich dabei um eine direkte Interaktion handelt.

#### 4.2. Mx1 bindet Kif5B für den Proteintransport entlang von Mikrotubuli

Die Aufrechterhaltung der Epithelzellmembranpolarität und die Verteilung von Lipiden und Proteinen zur jeweiligen Membrandomäne setzen hoch spezialisierte Mechanismen voraus. Sekretorische Kompartimente, verschiedene endosomale Kompartimente, Motorproteine, Adapterproteine, Lektine und Rab-GTPasen sind Teil der komplexen Sortier- und Transportmaschinerie. Diese gewährleistet die Beförderung von Lipiden und Proteinen zur korrekten Zielmembran.

Mx1 wurde als eine neue Komponente von apikalen post-Golgi Vesikeln identifiziert (Hoff et al., 2014). Nach ausführlichen Untersuchungen konnte Mx1 eine Rolle an apikalen Transportprozessen zugesprochen werden. Dies wurde bereits für andere Mitglieder der Dynamin-Superfamilie postuliert (Hoff et al., 2014; Ramachandran & Schmid, 2018). Diese Entdeckung ist bemerkenswert, wenn man die sehr gut beschriebene Funktion von MxA als Regulator der Immunantwort bedenkt (Haller & Kochs, 2002; Haller et al., 2007b, 2015). Die Erkenntnis ist aber auch vielversprechend, da es bereits Studien zur möglichen Funktion von Mx1 bei verschiedenen, zellulären Prozessen gibt (Toyokawa et al., 2007a, 2007b; Racicot & Ott, 2011; Racicot et al., 2012). Sowohl der molekulare Mechanismus als auch die funktionelle Rolle von Mx1 bei diesen Vorgängen sind allerdings noch nicht aufgeklärt. Außerdem versteht man noch nicht genau, an welchen Prozessen Mx1 beteiligt ist. Deshalb war das zweite Ziel dieser Arbeit, die Funktionsweise von Mx1 im apikalen Proteintransport aufzuklären.

Bislang konnten neben dem Mikrotubuli-Zytoskelett (Horisberger, 1992; Racicot & Ott, 2011; Hoff et al., 2014) keine weiteren involvierten Komponenten der zellulären Transportmaschinerie, die zusammen mit Mx1 fungieren, identifiziert werden. Die Daten dieser Arbeit untermauern die zentrale Rolle von Mx1 im apikalen Proteintransport, denn zum ersten Mal konnte die Assoziation zwischen Mx1 und dem Motorprotein Kif5B gezeigt werden. Diese Interaktion ist für die Stabilisierung der Assoziation zwischen apikalen Transportvesikeln und dem Mikrotubuli-Netzwerk entscheidend. Somit ist Mx1 für die Ausbildung eines Transportkomplexes verantwortlich, der aus Vesikel und Motorprotein besteht. Dies wurde bereits vermutet (Hoff, 2015). Zusätzlich dient Mx1 als wichtiger Fissionsfaktor, der an der Biogenese von Vesikeln beteiligt ist und die Vesikelabknospung unterstützt.

Aufgrund der Fähigkeit von Mx1 an Membranen zu binden und seiner Ähnlichkeit zu klassischen Dynaminen ist es sehr wahrscheinlich, dass Mx1 als membranorganisierendes Element fungiert (Faelber et al., 2013). Die Fähigkeit von Mx1 zur Vesikelabschnürung ist ebenfalls gut vorstellbar. Andere Aufgaben, bei denen eine Beteiligung von Mx1 beschrieben wurde, sind die Endozytose (Palm et al., 2010; Jatiani

& Mittal, 2004; Shah et al., 2006) und die Regulation der unkonventionellen Sekretion (Toyokawa et al., 2007a, 2007b).

#### **4.2.1. Mx1 assoziiert mit zellulären Kompartimenten**

Der gerichtete Proteintransport in polaren Epithelzellen ist ein komplexes und streng reguliertes System. Neben verschiedenen spezialisierten Transportrouten, die es ermöglichen die apikalen und basolateralen Membrandomänen mit Proteinen und Lipiden zu versorgen, sind auch, abhängig vom Transportweg, unterschiedliche zelluläre Kompartimente sowie verschiedene Protein- und Lipidkomponenten beteiligt (zur Übersicht siehe: Rodriguez-Boulán et al., 2005). Innerhalb dieses Systems scheint Mx1 eine wichtige Rolle einzunehmen. Bislang konnte jedoch kein eindeutiges, spezifisches Mx1-Kompartiment identifiziert werden. Die neuesten Studien stellen sogar die Hypothese auf, dass humanes MxA in membranlose Kondensate, die funktionelle, eigenständige Organellen formen und sich in ihrer Form verändern können, organisiert ist (Davis et al., 2018, 2019). Allerdings lässt sich MxA bzw. Mx1 in Epithelzellen spezifisch an unterschiedlichen zellulären Kompartimenten, Endosomen und sogar Exosomen nachweisen, wie zahlreiche Studien sowie diese Arbeit belegen (s. Abb. 3.9. und Accola et al., 2002; Stertz et al., 2006; Dick et al., 2015; Hoff et al., 2014, Yuan & Sehgal, 2016; Racicot et al., 2012).

Auf dem Weg vom ER zum Golgi-Apparat passieren die synthetisierten Proteine die tubulovesikuläre Membranansammlungen des ERGIC (Appenzeller-Herzog & Hauri, 2006). Ein Markerprotein, welches hauptsächlich an diesen Membranen anzutreffen ist, ist ERGIC53 (Hauri et al., 2000; Schweizer et al., 1988). Vor allem an diesen ERGIC53-positiven Strukturen ließ sich Mx1 fluoreszenzmikroskopisch sowie biochemisch nachweisen (s. Abb. 3.9. A, D und E). Das ERGIC dient als Sortierstation für den retrograden und anterograden Proteintransport. Besonders interessant ist die Lokalisierung von Mx1 am ERGIC wegen der bereits beschriebene Assoziation von humanem MxA mit dem ER sowie mit COPI-positiven Membranen des glatten ER bzw. dem Intermediärkompartiment (Stertz et al., 2006; Numajiri et al., 2011, Dick et al., 2015; Accola et al., 2002; Reichelt et al., 2004). Aufgrund dessen könnten Mx-Proteine, unabhängig von ihrer antiviralen Aktivität, an der Umstrukturierung dieser Kompartimente involviert sein und als membranmodellierende Faktoren agieren. Es wurde ebenfalls postuliert, dass MxA am Transport zum oder vom glatten ER beteiligt ist, da die Expression einer nicht-funktionalen MxA Mutante zu einem ausgedehnten glatten ER-Kompartiment führt und das Gleichgewicht der Membranbewegung stört (Accola et al., 2002). Betrachtet man das ERGIC und das dort befindliche ERGIC53, so fällt auf, dass diese einige interessante Eigenschaften aufweisen. Es ist bestens bekannt, dass

das Intermediärkompartiment im frühen sekretorischen Proteintransport fungiert (Saraste & Marie, 2018). Das Markerprotein ERGIC53 im Besonderen betrachtet, ist ein wichtiger Rezeptor für eine limitierte Gruppe von Glykoproteinen und es transportiert diese vom ER zum ERGIC und zum Golgi-Apparat (zur Übersicht siehe: Zhang et al., 2009). Die Lokalisation von Mx1 am ERGIC spricht daher für eine Beteiligung der großen GTPase am frühen sekretorischen Weg.

Für den intrazellulären Proteintransport spielen auch Endosomen, sogenannte Sortierstationen, eine wichtige Rolle. Jedes endosomale Kompartiment innerhalb des Netzwerkes weist eine unterschiedliche Identität auf (Elkin et al., 2016). Diese wird z.B. durch die Anwesenheit von verschiedenen Rab-Proteinen, kleine GTPasen der Ras-Superfamilie, bestimmt. Diesen G-Proteinen kommt eine Schlüsselrolle in der Regulierung des Membrantransports und der Kompartimentierung des Endomembransystems zu, denn sie kontrollieren Andock- und Fusionsprozesse von Vesikeln (Elkin et al., 2016; Stenmark, 2009). Proteine passieren auf ihrem biosynthetischen Transportweg diese Endosomen. Für den *Lipid Raft*-unabhängigen apikalen Transport sind Rab4-, Rab8- sowie Rab11-positive Kompartimente wichtig (Cramm-Behrens et al., 2008). Für Mx1, das auf *Lipid Raft*-unabhängig transportierten p75<sup>NTR</sup>- und LPH-positiven Vesikeln vorkommt, konnte die Lokalisation an diesen drei Kompartimenten bereits beschrieben werden (Hoff et al., 2014). Rab4 und Rab11 sind unter anderem auf Recyclingendosomen zu finden (Somsel & Wandinger-Ness, 2000; Sonnichsen et al., 2000, Brown et al., 2000). Vom Recyclingendosom aus gelangen Proteine zur apikalen Membran. Damit ist dieses Kompartiment eine wichtige Station im endosomalen Sortiersystem. Rab8 ist im gemeinsamen Recyclingendosom zu finden und agiert als Regulator des post-Golgi Transports vom TGN zur basolateralen Plasmamembran (Huber et al., 1993a, 1993b, 1995; Ang et al., 2003; Weisz & Rodriguez-Boulán, 2009). In dieser Arbeit steht das Rab8-positive Kompartiment im Fokus der Charakterisierung von Mx1-positiven Kompartimenten, da auch eine Beteiligung von Rab8 am apikalen Transport nachgewiesen werden konnte (Sato et al., 2007; Cramm-Behrens et al., 2008; Faust et al., 2008; Sato et al., 2014). Die Kolokalisation von Mx1 mit dem endosomalen Netzwerk, insbesondere mit Rab8, konnte in der vorliegenden Arbeit ergänzend zur bereits durchgeführten Studie nachgewiesen werden (s. Abb. 3.9. B, D und E sowie Hoff et al., 2014). Interessant ist vor allem, dass sowohl die SI als auch die LPH an Rab8-positiven Endosomen vorzufinden sind (Cramm-Behrens et al., 2008). Beide Proteine sind jedoch an spezifischen Membrandomänen lokalisiert, von denen die Vesikelabknosung stattfindet (Jacob & Naim, 2001). Auf dem Weg zur apikalen Membran trennen sich die Proteine in *Lipid Raft*-abhängige bzw. -unabhängige Vesikelpopulationen auf (Jacob & Naim, 2001; Jacob

et al., 2003). Möglicherweise ist Mx1 hierbei für die spezifische Abspaltung der *Lipid Raft*-fehlenden Domänen mit verantwortlich. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass die große GTPase ausschließlich auf *Raft*-unabhängigen Vesikeln nachzuweisen ist und daher am *Lipid Raft*-unabhängigen Transport beteiligt ist (Hoff et al., 2014). Ein anderes Protein, das im Gegensatz dazu *im Lipid Raft*-abhängigen Transport fungiert, ist FAPP2. Dieses Protein wird für den Transport vom Golgi-Komplex zur apikalen Membran benötigt (Vieira et al., 2005) und ist genau wie Mx1 in der Lage Membranen zu tubulieren (Cao et al., 2009). Die hohe Kolokalisation von Mx1 mit Rab8 spricht für eine Beteiligung von Mx1 an späteren Schritten des sekretorischen Vesikeltransports. Diese Theorie würde ebenfalls die Lokalisationen von Mx1 an anderen Endosomen, die an apikalen Transportprozesse involviert sind, erklären (Hoff et al., 2014; Yuan & Sehgal, 2016).

Des Weiteren konnte die Lokalisation von Mx1 an Alix-positiven Strukturen nachgewiesen werden. Alix gilt als Markerprotein für MVBs, welche die Sekretion von Proteinen unabhängig von der ER/Golgi-Route durch einen unkonventionellen Sekretionsprozess vermitteln. Während der Reifung der MVBs aus frühen Endosomen werden Proteine ohne Signalsequenz in intraluminale Vesikel (ILVs) durch inverse Einstülpung der Membran verpackt und nach der Fusion der MVBs mit der Plasmamembran mittels Exosomen sekretiert. Die Abschnürung der ILVs wird durch verschiedene Faktoren bewerkstelligt. Bei diesem Prozess spielen vor allem die Proteine des ESCRT (engl.: *endosomal sorting complex required for transport*) eine zentrale Rolle (Raposo & Stoorvogel, 2013; Colombo et al., 2014; Hessvik & Llorente, 2018). Denkbar ist eine Beteiligung von Mx1 bei der Membrankrümmung oder -Abschnürung während der Biogenese der ILVs bzw. Exosomen. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist die Beobachtung, dass Mx1 durch einen unkonventionellen Weg aus der Zelle sekretiert wird (Toyokawa et al., 2007a) und bereits in Exosomen nachgewiesen wurde (Racicot et al., 2012). Die Daten dieser Arbeit stimmen sehr gut mit diesen Studien überein. Denn bei der Untersuchung der Gal3-Sekretion zeigte sich, dass Mx1 einen eindeutigen Einfluss auf den Transport dieses unkonventionell sekretierten Proteins hat (s. Abb. 3.18. sowie Hoff et al., 2014). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Mx1 an verschiedenen Stationen des sekretorischen Transportweges involviert ist und eine wichtige Rolle im exozytotischen Transport bestimmter Vesikelpopulationen besitzt. Die Frage, ob Mx1 nun eine Funktion bei der Bildung von MVBs besitzt oder den Transport zur apikalen Membran steuert, bleibt jedoch offen.

#### 4.2.2. Mx1 assoziiert dynamisch mit intrazellulären Membranstrukturen

Zelluläre Membranen vermitteln den vesikulären Transport. Diese formen sich am Donorkompartiment, werden von dort zusammen mit dem zu transportierenden Cargo als Vesikel abgeschnürt und fusionieren letztendlich mit der Ziellmembran. Dabei sind eine Reihe verschiedener Proteine involviert, wie z.B. Rab-Proteine, zytosolische Mantelproteinen, Dynamine sowie Proteine, welche die Krümmung der Membran bewirken (Herrmann & Spang, 2015; Bonifacino & Glick, 2004; Vassilieva & Nusrat, 2008; McMahon & Boucrot, 2015). Die Ansammlung vieler Proteine auf Kompartimenten und Transportvesikeln benötigt eine streng regulierte sowie sehr dynamische Assemblierung und Disassemblierung der membranassoziierten Proteine (Javanainen et al., 2013; Marrink & Tieleman, 2013; Goose & Sansom, 2013; Dunton et al., 2014). Entscheidend ist dies nicht nur für die Organisation der Proteinkomponenten an den intrazellulären Membranen (Kusumi et al., 2011; Saka et al., 2014) sondern auch für deren Funktion an den Membranen (Chavent et al., 2018).

Obwohl die PH-Domäne fehlt, ist humanes MxA in der Lage *in vitro* mit negativ-geladenen Phospholipiden zu assoziieren. Die Bindung bewirkt eine Krümmung und die Tubulierung der Membran (Accola et al., 2002; von der Malsburg et al., 2011). Für canines Mx1 konnte die Membranbindung ebenfalls nachgewiesen werden (Hoff et al., 2014; von der Malsburg et al., 2011). Wegen der eindeutigen und bereits beschriebenen Beteiligung von Mx1 im apikalen Proteintransport in MDCK-Zellen, stellt sich jedoch die Frage, welche Rolle Mx1 an Membranen spielt. Bedenkt man die Vielzahl an Proteinkomponenten, die an zelluläre Membranen binden, ist auch die Dynamik, mit der Mx1 mit Membranen assoziiert, interessant. Ein besonderes Merkmal von Mx1 und anderen Mitgliedern der Dynamin-Familie ist ihre Fähigkeit zur Selbstassemblierung und die Anordnung in Oligomeren. In Lösung liegen Dynamin und MxA überwiegend als Tetramere vor (Muhlberg et al., 1997; Gao et al., 2010). Die Oligomerisierung in ringförmige oder helikale Strukturen wird durch die Affinität für Membranlipide begünstigt, wodurch die Membranen-Tubulierung möglich ist (Hinshaw & Schmid, 1995; Sweitzer & Hinshaw, 1998; Marks et al., 2001; Roux et al., 2006, 2010; Faelber et al., 2012). Im Fall von Dynamin stimuliert die Membranbindung die GTPase-Aktivität (Accola et al., 2002; Stertz et al., 2006; von der Malsburg et al., 2011; Faelber et al. 2012). Dies deutet daraufhin, dass Dynamin in Lösung in einem autoinhibierten Zustand vorliegt und durch die Bindung an Membranen aktiviert wird (Reubold et al., 2015; Faelber & Daumke, 2018). Im Gegensatz dazu zeigt MxA keine erhöhte GTPase-Aktivität. Der Unterschied in der Aktivierung der GTP-Hydrolyse-Rate von Dynamin und MxA deutet darauf hin, dass sich die membrangebundenen Oligomere auf eine bislang unbekannte Weise unterscheiden. Vermutet wird, dass humanes MxA durch die Bindung an Membranen vor



der Degradation geschützt wird (Haller et al., 2007a; Verhelst et al., 2013). Einige MxA-Moleküle dissoziieren von der Membran und bilden stabile Tetramere zur antiviralen Funktion, wohingegen sich der Großteil an membranassoziiertem MxA in einem ruhenden, inaktiven Zustand befindet (von der Malsburg et al., 2011; Verhelst et al., 2013). Außerdem wurde postuliert, dass nach einer Virusinfektion die Membranbindung den Kontakt zu viralen Strukturen ermöglicht, wie zum Beispiel mit dem Nukleocapsid des La Crosse Virus (Reichelt et al., 2004).

Canines Mx1, als Teil des Endomembransystems, weist ein dynamisches Verhalten auf (s. Abb. 3.10.), das durch die Assemblierung und Disassemblierung an zellulären Membranen charakterisiert ist. Diese Beobachtung unterscheidet sich von der Annahme, dass membrangebundenes MxA in einer latenten, inaktiven Form vorliegt. Zunächst konnte bei der Untersuchung der Assoziation von Mx1 mit Membranen ein rascher Austausch von Mx1-Molekülen beobachtet werden. Dies ist damit zu erklären, dass in dieser kurzen Phase lösliche, zytosolische Mx1-Moleküle in das gebleichte Areal diffundieren und sich gleichzeitig gebleichte Moleküle aus dem Bereich herausbewegen. Außerdem könnte es sich dabei auch um eine rasche, aber instabile Bindung an die Membranen und die nachfolgende Ablösung von Mx1 handeln. Anschließend zeigte sich ein langsamer Anstieg der Fluoreszenz, welcher das stabile Binden des Proteins an die Membran widerspiegelt. Dies legt die Ausbildung von stabilen Mx1-Oligomeren nahe. Dieser Vorgang wird durch die Bindung an die Membran gefördert, weshalb immer mehr Proteine an die Membran rekrutiert werden. Zudem findet auch trotz dessen ein Ablösen des Proteins von der Membran statt, denn in der GDP-gebundenen Form kommt es zur Disassemblierung des Mx-Oligomers (Chen et al., 2017). Dies könnte erklären, warum ein großer Anteil an Mx1 ausgetauscht wurde.

Auffällig ist ein geringer Anteil von Mx1, der eine feste Membranbindung zeigte und während des Beobachtungszeitraums nicht ausgetauscht wurde. Diese ähnlich große stabile Fraktion konnte auch bei einer Mx1-Mutante, in welcher das Membran-Interaktionsmotiv mutiert wurde (s. Kapitel 4.2.4), beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass an der Assoziation von Mx1 mit zellulären Membranen möglicherweise weitere Faktoren beteiligt sind, die eine stabile Interaktionsbasis bilden. Denkbar sind Bindungspartner von Mx1, die sich ebenfalls an Membranen befinden und so die Assoziation von Mx1 an zelluläre Membranen stabilisieren. Allerdings ist nur wenig über mögliche Bindungspartner von Mx1 bekannt. In Interaktionsstudien konnte gezeigt werden, dass rekombinantes MxA zusammen mit Dynamin Heterooligomere bilden kann (Jatiani & Mittal, 2004; Praefke & McMahon, 2004). Dies ist möglicherweise aufgrund ihrer ähnlichen Struktur möglich. Studien zeigten, dass die Stieldomäne die zentrale Stelle für die Oligomerisierung von Dynamin und MxA ist (Gao et al., 2010; Faelber et al.,

2011; Ford et al., 2011). Die Stieldomänen weisen eine Vier-Helix-Bündel Faltung auf und ordnen sich im Zickzack-Muster über konservierte Interaktionsflächen an, wodurch stabile Dynamin- bzw. MxA-Dimere entstehen (Gao et al., 2010; Faelber et al., 2011; Faelber et al., 2012). Die Oligomerisierung wird über separate Interaktionsflächen sowie die L4-Schleifenregion im Fall von MxA vermittelt (s. Kapitel 4.2.4) (Gao et al., 2010, 2011; Faelber et al., 2011; Ford et al., 2011). Beide Proteine zeigen also auch einen ähnlichen Oligomerisierungs-Mechanismus. Die Frage, ob MxA und Dynamin auch an zellulären Membranen miteinander interagieren können und so die Umformung von Membranen bewirken, ist jedoch nicht belegt.

Ein anderer, möglicher Assoziationspartner von Mx1 auf apikalen Transportvesikeln könnte Gal3 sein. Dass beide Proteine an gemeinsamen endosomalen Kompartimenten lokalisiert sind, konnte bereits gezeigt werden (Hoff et al., 2014). Gal3 gehört zur Proteingruppe der Lektine. Es verlässt die Zelle über einen unkonventionellen Sekretionsmechanismus hauptsächlich über die apikale Membran. Nach anschließender Internalisierung dient es Sortierrezeptor des *Lipid Raft*-unabhängigen Transportweges (zur Übersicht siehe: Hönig et al., 2015). Der Zusammenschluss zu hochmolekularen Clustern sorgt durch Quervernetzung mehrerer Gal3-Moleküle für die Anreicherung von Cargo-Proteinen. Vermutet wird, dass die Komplexbildung von Gal3 mit den zu transportierenden Proteinen an der Stelle der Vesikelabknospung grundlegend für die Ausbildung von apikalen Transportvesikeln ist und den Mechanismus der apikalen Proteinsortierung darstellt (Delacour et al., 2007; Hönig et al., 2015). Der *Knockdown* des Lektins führte zur Fehlsortierung von p75<sup>NTR</sup> und der LPH zur basolateralen Membrandomäne, während der Transportprozess der *Lipid Raft*-abhängig transportierten SI davon unberührt blieb (Delacour et al., 2006). Verschiedene Arbeiten konnten unabhängig davon nachweisen, dass Mx1 auf unkonventionellem Weg sekretiert wird (Toyokawa et al., 2007a; Racicot et al., 2012) und es wurde die Vermutung aufgestellt, dass Mx1 ovine Drüsenepithelzellen ein Regulator der unkonventionellen Sekretion sind (Toyokawa et al., 2007b). Aus diesem Grund ist vorstellbar, dass Mx1 und Gal3 gemeinsam im intrazellulären Transport fungieren. Die direkte Interaktion zwischen Mx1 und Gal3 konnte allerdings bislang noch nicht nachgewiesen werden.

Denkbar ist aber auch, dass Mx1 mit Proteinen, die eine Transmembrandomäne oder spezialisierte Domänen für die Membranbindung besitzen, interagiert. Solche Interaktionspartner an der Membran wurden für Mx1 jedoch noch nicht beschrieben.

#### **4.2.3. Die Interaktion zwischen Kif5B, Mikrotubuli und apikalen Transportvesikeln wird durch Mx1 stabilisiert**

Die Funktion von Mx1, die unabhängig von der antiviralen Immunantwort ist, wirft trotz mehrerer Studien noch einige Fragen auf. Daher stellte sich im Rahmen dieser Arbeit die wichtige Fragestellung: Welche funktionelle Rolle besitzt Mx1 in intrazellulären Transportprozessen? Diese Frage ist noch wenig erforscht. Zwar konnte eine direkte Beteiligung von Mx1 im apikalen Proteintransport nachgewiesen werden, aber der zugrunde liegende Mechanismus blieb unklar. Mittlerweile gibt es zahlreiche Arbeiten, welche die Assoziation von Mx1 mit dem Zytoskelett beschreiben (Horisberger, 1992; Mushinski et al., 2009; Racicot et al. 2010; Hoff et al., 2014; Brown et al., 2015; Yuan & Sehgal, 2016). Daher wurde die Vermutung aufgestellt, dass Mx1 eine entscheidende Komponente beim intrazellulären Transport von Vesikeln entlang der Zytoskelett-Elemente darstellen könnte (Hoff et al., 2014).

Im Rahmen des intrazellulären Proteintransports werden Vesikel mit Hilfe von Motorproteinen entlang von Mikrotubuli transportiert. Wegen ihrer Größe und polaren Morphologie benötigen Neuronen, aber auch Epithelzellen, das Mikrotubuli-Zytoskelett für den Transport über sehr lange Strecken (Schroer, 2000). Interessanterweise zeigen Mx1-positive Kompartimente in MDCK-Zellen ein dynamisches Verhalten, das durch zahlreiche Fusions- und Fissionsereignisse charakterisiert ist (s. Abb. 3.21. und Hoff et al., 2014). Daher war es in diesem Zusammenhang besonders wichtig herauszufinden, ob diese Dynamik abhängig von einem intakten Mikrotubuli-Zytoskelett ist. Nach Nocodazol-Behandlung löste sich das filamentöse Tubulingerüst auf. Es zeigten sich allerdings keine morphologischen Veränderungen in der Anordnung der Mx1-positiven Strukturen (s. Abb. 3.11.). Dies lässt darauf schließen, dass es sich um eine transiente Bindung von Mx1-positiven Strukturen an Mikrotubuli handelt, wie es auch bereits im Jahr 1992 von Horisberger postuliert wurde. Einhergehend mit einem deutlich verminderten Langstreckentransport zeigten Nocodazol-behandelte Zellen einen verstärkten Kurzstreckentransport (s. Abb. 3.12.). Da der intrazelluläre Transport von Vesikeln und Organellen in Abwesenheit von Mikrotubuli auch entlang von Aktin-Filamenten erfolgen kann (Kuznetsov et al., 1992), ist es gut vorstellbar, dass der Transport der Mx1-positiven Strukturen nach der Depolymerisierung der Mikrotubuli mit Hilfe des Aktin-Netzwerks weiter erfolgt. Damit konnte bestätigt werden, dass der Transport von Mx1-positiven Kompartimenten abhängig von einem intakten Mikrotubuli-Netzwerk ist, da sich Mikrotubuli durch die ganze Zelle erstrecken und den Langstreckentransport von Organellen oder Vesikeln ermöglichen. Aktin-Filamente sind dagegen sehr kurz sowie stark verzweigt, weshalb nur ein Transport über kurze Strecken erfolgen kann (Atkinson et al., 1992; Langford, 1995).

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit die Interaktion von caninem Mx1 mit Tubulin bestätigt werden (s. Abb. 3.13. und Abb. 3.14.). Auch Mx-Homologe anderer Spezies assoziieren mit Elementen des Zytoskeletts. So konnte die Interaktion von humanem MxA mit Mikrotubuli und Aktin-Filamenten sowie die Assoziation von ovinem Mx1 mit  $\beta$ -Tubulin nachgewiesen werden (Horisberger, 1992; Racicot & Ott, 2011). Dabei ist Mx1 während der Interphase mit den für den Vesikeltransport essentiellen Mikrotubuli verknüpft. Während der Mitose ist die große GTPase am Spindelapparat lokalisiert. Es ist nicht genau klar, ob Mx1 eine regulierende Funktion während der Mitose einnimmt, oder ob es sich um die bestehende Assoziation der Interphase handelt (Racicot & Ott, 2011). Allerdings konnte die Assoziation von humanem MxA mit Mikrotubuli auch in Krebszelllinien beobachtet werden (Mushinski et al., 2009; Brown et al., 2015). Dabei wird eine regulatorische Rolle von MxA auf den Zellzyklus angenommen. Eine wichtige Aufgabe von MxA ist die Sensitivität von Krebszellen gegenüber Chemotherapeutika, welche Tubulin-stabilisierend wirken und den induzierten Zellzyklusarrest einleiten, sowie die Apoptose zu fördern (Brown et al., 2015). Auch für humanes MxB konnte eine Beteiligung am Zellzyklus nachgewiesen werden (King et al., 2004). Ferner blockiert die MxA-Expression die Motilität von humanen Prostatakrebszellen und kann so das invasive Verhalten der Tumorzellen unterdrücken. Aus diesem Grund wurde MxA sogar als Tumorsuppressor beschrieben (Mushinski et al., 2009; Glymph et al., 2013). Die Assoziation von MxA mit den Mikrotubuli hängt dabei von der GTPase- bzw. Selbstassemblierungs-Aktivität ab (Mushinski et al., 2009). Interessanterweise ist eine Reihe von Mutationen im MxA-Gen mit verschiedenen Krebserkrankungen assoziiert. Vor allem Mutationen, welche die Veränderung der Proteinstruktur bewirken, sind verantwortlich für die Tumorgenese und die Entwicklung bestimmter Krebserkrankungen (Hu et al., 2015).

Die direkte Interaktion mit Tubulin konnte auch für ein weiteres Mitglied der Dynamin-Superfamilie nachgewiesen werden. Bevor es als entscheidende Komponente der Endozytose-Maschinerie entdeckt wurde (van der Bliek & Meyerowitz, 1991), wurde murines Dynamin zunächst als Mikrotubuli-bindendes Protein identifiziert (Shpetner & Vallee, 1989). Die physiologische Relevanz der Assoziation zwischen Dynamin und Mikrotubuli ist kaum untersucht und weitgehend unverstanden. Es wird vermutet, dass Dynamin-2 eine wichtige Komponente des Zentrosoms ist, indem es  $\gamma$ -Tubulin bindet und an der Mikrotubuli Organisation beteiligt ist (Thompson et al., 2004). Später konnte dann nachgewiesen werden, dass Dynamin-2 die dynamische Instabilität von Mikrotubuli reguliert. Aufgrund einer Mutation in der PH-Domäne des Proteins kommt es zu anormalen Mikrotubuli-Bündeln, die eine erhöhte Stabilität aufweisen (Tanabe & Takei, 2009).

Aus diesem Grund kommt die Frage auf, warum Mx1 mit Tubulin assoziiert und mit welchem Mechanismus die Bewegung von Mx1-positiven Strukturen entlang von Mikrotubuli ermöglicht wird. Bindet Mx1 direkt an Tubulin? Oder fungiert es als Adapterprotein zwischen apikalen Transportvesikeln und den Mikrotubuli? Sehr wahrscheinlich ist, dass Mx1 aufgrund seiner hohen Dynamik eine Verbindung zwischen dem Cargo und den Mikrotubuli mit Hilfe von Motorproteinen herstellt. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal die Interaktion zwischen Mx1 und dem Motorprotein Kif5B beschrieben werden. Es ist also gut denkbar, dass Mx1 die Rolle eines Adapterproteins zwischen den Vesikeln und dem Mikrotubuli-Zytoskelett einnimmt. Die Bindung an Kif5B wäre daher eine plausible Erklärung für die beschriebene Dynamik von Mx1-haltigen Strukturen. Diese werden in Abhängigkeit eines intakten Mikrotubuli-Zytoskelett über lange Strecken transportiert (s. Abb. 3.12). Die Bewegung entlang von Mikrotubuli ermöglicht vermutlich das Motorprotein. Dass es sich um eine funktionale Interaktion zwischen Mx1 und Kif5B handelt, zeigten Versuche zur Dynamik von Mx1-positiven Strukturen nach einem Kif5B-*Knockdown* (s. Abb. 3.20. H). Dabei war, analog zur Mikrotubuli-Depolymerisierung, ein eindeutiger Rückgang der Dynamik von Mx1-haltigen Strukturen sowie ein verringerter Transport dieser Strukturen zu erkennen. Dies verdeutlicht, dass die Assoziation von Mx1 mit Kif5B und den Mikrotubuli für die Dynamik und die Aufrechterhaltung der Dynamik *in vivo* eine essentielle Rolle spielt. Die Identifikation des Motorproteins als Mx1-Interaktionspartner beweist, dass die große GTPase an intrazellulären und membranabhängigen Transportprozessen beteiligt ist. Eine ähnliche Interaktion konnte für Kif5 und Protrudin, das sich am ER befindet, im post-Golgi Transport in Neuronen beobachtet werden. Dabei übt Protrudin die Funktion eines Adapterproteins aus, indem es einen Komplex mit Kinesin-Motorproteinen und membranassoziiertem Cargo bildet und so den polaren Vesikeltransport reguliert (Matsuzaki et al., 2011). Mittlerweile sind eine Reihe von verschiedenen Adapterproteinen identifiziert worden (Schroer, 2000). Dazu zählen z.B. die Familie der sogenannten zytoplasmatischen Linkerproteine (engl.: *cytoplasmic linker proteins*, CLIPs) sowie die Hook-Proteine und die Adapterprotein (AP)-Komplexe. Anders als Kinesine verfügen diese Proteine nicht über eine Motordomäne, vielmehr erkennen die Motorproteine die Adapterproteine, wodurch sie indirekt an die Vesikelmembran als Teil eines Proteinkomplexes binden (Hirokawa et al., 2009).

Die Motorproteine, wie in diesem Fall Kif5B, stellen wichtige Bindeglieder zwischen den Transportvesikeln und den Zytoskelett-Elementen dar. Kif5B gehört genau wie Kif5C zur Kinesin-1 Familie. Beide Motorproteine sind am apikalen Proteintransport beteiligt und befördern p75<sup>NTR</sup>-positive Vesikel in Richtung Plus-Ende der Mikrotubuli (Jaulin et al., 2007; Astanina & Jacob, 2010). Daneben existieren noch weitere Motorproteine, die

für den Transport zur apikalen Membran verantwortlich sind. Dazu zählen beispielsweise KifC3, das zum Minus-Ende der Mikrotubuli orientiert ist und für die apikale Beförderung des Influenza HA benötigt wird (Noda et al., 2001). Das Kif5B-Motorprotein ist, wie bereits beschrieben, zweifelslos im apikalen Proteintransport involviert, jedoch konnte kürzlich eine mögliche Beteiligung von Kif5B am basolateralen Transport von  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase-tragenden Vesikeln in Epithelzellen beschrieben werden (Cui et al., 2015). Erstaunlicherweise ist der Kif5B-vermittelte apikale Transport von  $\text{p75}^{\text{NTR}}$  polaritätsabhängig, denn nur in polaren MDCK-Zellen vermittelt Kif5B den Transport des Neurotrophinrezeptors (Jaulin et al., 2007). In unpolaren MDCK-Zellen hingegen wird ein anderes Kinesin zum  $\text{p75}^{\text{NTR}}$ -Transport benötigt (Xue et al., 2010). Eine mögliche Erklärung, wie der Kif5B-abhängige Transport zur apikalen Membran entlang der Mikrotubuli, die mit ihren Plusenden zur apikalen Domäne ausgerichtet sind, reguliert wird und warum die Proteine nicht zur basolateralen Membran gesteuert werden, sind posttranslationale Modifikationen der Mikrotubuli (s. Kapitel 1.4.3). PTMs regulieren die Effizienz mit der sich die Kif5-Proteine entlang der Mikrotubuli bewegen (Liao & Gundersen, 1998; Reed et al., 2006; Dunn et al., 2008). Vorstellbar ist daher, dass die Mikrotubuli, deren Plus-Ende zur apikalen Membran ausgerichtet ist, bestimmte posttranslationalen Modifikationen tragen, wie z.B., die Detyrosinierung (Bré et al., 1987, 1991; Jacobson & Mostov, 2007). Kinesin-1 Mitglieder binden bevorzugt an detyrosinierte Mikrotubuli und ermöglichen so den Transport verschiedener Proteine (Kreitzer et al., 1999; Liao & Gundersen, 1998; Lin et al., 2002). Sowohl detyrosinierte Mikrotubuli als auch Kif5B und Mx1 sind somit für den apikalen Proteintransport von wichtiger Bedeutung (Hoff et al., 2014; Zink et al., 2012), allerdings konnte noch nicht aufgeklärt werden, ob Mx1 bevorzugt mit detyr-Tubulin oder tyr-Tubulin assoziiert (s. Abb. 3.15.). Die einfachste Erklärung dafür könnte die perlenschnurartige Anordnung der beiden Tubulin-Varianten entlang eines Mikrotubulus sein (Zink et al., 2012).

Eine andere mögliche Erklärung des selektiven Transports von  $\text{p75}^{\text{NTR}}$  in polaren Zellen stellt die spezifische Bindung an die Cargo-Vesikel dar. Diese Bindung könnte unter anderem über Adapterproteine, wie z.B. Mx1, welche das Motorprotein mit dem jeweiligen Cargo verbinden, vermittelt werden. Kif5B könnte aber auch explizit in polaren Zellen die Abknospung der  $\text{p75}^{\text{NTR}}$ -haltigen Vesikel vermitteln (Jaulin et al., 2007; Jacobson & Mostov, 2007). Durch Hemmung der Kif5-Aktivität wird in polaren Zellen sowohl der Transport als auch die Abknospung von  $\text{p75}^{\text{NTR}}$ -tragenden Vesikeln blockiert (Kreitzer et al., 2000; Jaulin et al., 2007). Eine wichtige Beobachtung ist, dass nach einem Mx1-Knockdown weniger  $\text{p75}^{\text{NTR}}$  an der apikalen Membran von MDCK-Zellen nachzuweisen ist (Hoff et al., 2014). Diese Beobachtung und die Daten dieser Arbeit sind sehr gut mit der Studie von Jaulin und Kollegen vereinbar. Mx1 könnte demnach als

Adapterprotein fungieren und zusammen mit Kif5B die Vesikelabschnürung unterstützen (s. Kapitel 4.2.4). Ein erster Hinweis dafür ist, dass für den apikalen Transport des Neurotrophinrezeptors p75<sup>NTR</sup> sowohl Kif5B als auch Dynamin benötigt werden (Kreitzer et al., 2000). Interessant ist auch, dass Kif5C an Transportprozessen nach Verlassen des TGN beteiligt ist (Astanina & Jacob, 2010). Möglicherweise fungiert Kif5B ebenfalls in späteren Transportprozessen nach dem Verlassen des TGN. Ein Hinweis hierfür ist, dass die Interaktion zwischen Kif5B und Mx1 bevorzugt an Rab8- und Alix-positiven Strukturen stattfindet (s. Abb. 3.17.). Daher spielt die Interaktion vor allem im späten sekretorischen Weg eine wichtige Rolle.

Der *Knockdown* bzw. *Knockout* von Mx1 führt nicht nur zu einer signifikanten Reduktion von p75<sup>NTR</sup> an der apikalen Plasmamembran, sondern auch zu einem gehemmten Transport von Gal3 und Clusterin/gp80 (s. Abb. 3.18. und Hoff et al., 2014). Gal3 wird auf unkonventionellem Weg ins apikale Milieu sekretiert (Lindstedt et al., 1993; Sato et al., 1993). Der genaue Mechanismus der Sekretion des Glykoproteins ist umstritten und verschiedene Routen für die Sekretion von Gal3 sind vorstellbar. Diese sind bereits in zahlreichen Studien diskutiert worden (zur Übersicht siehe: Popa et al., 2018). Vor Kurzem konnten Bänfer und Kollegen zeigen, dass die unkonventionelle Sekretion von Gal3 in MDCK-Zellen ausschließlich mit Hilfe von Exosomen verwirklicht wird (Bänfer et al., 2018). Diese Beobachtung ist insoweit interessant, da Mx1 mit Alix-positiven Strukturen kolokalisiert und in der exosomalen Fraktion nachzuweisen ist (s. Abb. 3.9 C, D und E). Außerdem führt der *Mx1-Knockout* zu einer signifikanten Reduktion der Gal3 Menge. Interessanterweise konnte die Sekretion von Gal3 durch die Zerstörung des Mikrotubuli-Zytoskeletts mittels Nocodazol verhindert werden (Lindstedt et al., 1993). Dies bestärkt die Hypothese, dass Mx1 an der Biogenese von Exosomen oder dem Transport von Exosomen beteiligt ist (s. Kapitel 4.2.1). Das Glykoprotein Clusterin/gp80 wird im Gegensatz zu Gal3 klassisch über den ER/Golgi-Transportweg in das Medium polarer MDCK-Zellen sekretiert (Parczyk & Kondor-Koch, 1989). Clusterin/gp80 wird vor allem apikal sekretiert, lässt sich aber auch im basolateralen Medium nachweisen (Urban et al., 1987). Die Sekretion verläuft abhängig von Mikrotubuli (Grindstaff et al., 1998). Der Mangel an Mikrotubuli mit detyrosiniertem Tubulin führt zu einem geminderten Transport des Glykoproteins zur apikalen Membran (Zink et al., 2012). Bemerkenswert ist, dass der *Mx1-Knockout* nicht den basolateralen Transport von Gal3 oder Clusterin/gp80 beeinflusst. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Mx1 den gerichteten Transport der Proteine beeinflusst, nicht aber den Sortierprozess.

Die Tatsache, dass die Bindung von Kif5B an apikale Transportvesikel durch die Anwesenheit von Mx1 begünstigt wird, bestärkt die Funktion von Mx1 als Adapterprotein

(Abb. 3.18. G). Andererseits könnte die Verknüpfung von Mx1 an Kif5B indirekt, mit Hilfe weiterer Adapterproteine, vermittelt werden. Beispielsweise interagiert die Interferon-induzierte GTPase (*Interferon-inducible GTPase*, IIGP) aus der Familie der großen GTPase, mit dem Mikrotubuli-Adapterprotein Hook-3 (Zerrahn et al., 2002; Kaiser et al., 2004), das sowohl Dynein als auch Dynactin binden kann (Olenick & Holzbaur, 2019). Trotz der geringen Sequenzähnlichkeit zu den IFN-induzierbaren GTPase-Familienmitgliedern, wird IIGP wegen biochemischen und biologischen Charakteristika zur Superfamilie der Dynamine gezählt (Praefcke & McMahon, 2004; Uthaiyah et al., 2003). IIGP ist genau wie Mx1 mit intrazellulären Membranen assoziiert, vor allem am ER und dem Golgi-Apparat (Taylor et al., 1997; Zerrahn et al., 2002; Kaiser et al., 2004). Daher ist eine Beteiligung von IIGP, das eine funktionelle Verwandtschaft zu GTPasen der Dynamamin-Superfamilie (hGBP1, MxA, Dynamin) zeigt, zusammen mit Hook-3 an membranabhängigen, intrazellulären Transportprozesse plausibel (Zerrahn et al., 2002; Kaiser et al., 2004).

Aufgrund der Interaktion mit krankheitsassoziierten Proteinen wird Kinesin-1 mit verschiedenen Pathomechanismen in Verbindung gebracht, darunter Alzheimer, Parkinson oder der Huntington-Krankheit (Gerdes & Katsanis, 2005; Endow et al., 2010). Eine weitere, erstaunliche Beobachtung in diesem Kontext ist, dass MxA-Polymorphismen mit der Alzheimer-Krankheit assoziiert sind. MxA ist dabei möglicherweise an der Pathogenese der Krankheit involviert. Der genaue Zusammenhang ist aber unbekannt (Ma et al., 2012). Für zukünftige Studien wäre es sehr interessant den Einfluss von MxA an der Entstehung der Alzheimer-Krankheit zu untersuchen, wobei vor allem berücksichtigt werden sollte, dass der Kif5B-vermittelte Transport des  $\beta$ -Amyloid-Vorläuferproteins sehr wahrscheinlich an der Krankheitsentstehung von Alzheimer eine wichtige Rolle spielt (Stokin et al., 2005; Terada et al., 2010; Hirokawa et al., 2010).

#### 4.2.4. Mx1 unterstützt den Prozess der Vesikelabschnürung

Die Fähigkeit klassischer Dynamine mit Membranen zu assoziieren wird vor allem der PH-Domäne zugeschrieben. Diese bindet bevorzugt an PI(4,5)P<sub>2</sub> Phospholipide. Die Rekrutierung an die Membran erfolgt über elektrostatische Interaktion zwischen einer positiv-geladenen Lipid-Bindungstasche und den negativ-geladenen Kopfgruppen der Phospholipide. Dies und die Assemblierung in ringförmige bzw. helikale Strukturen führen zur Bildung von Fissionsstrukturen, die nach der GTP-Hydrolyse abgeschnürt und als endozytotische Vesikel von der Plasmamembran abgelöst werden (Mattila et al., 2005; Ramachandran et al., 2009). Dabei sind in einem Dynamin-Oligomer, ähnlich wie bei Mx1, die GTPase-Domänen nach außen gerichtet und die PH-Domänen sind nach



innen orientiert (Faelber et al., 2013). Klassisches Dynamin und Mx1 weisen einen ähnlichen Mechanismus der Oligomerisierung auf. Dabei sind bestimmte Interaktionsflächen innerhalb der Stabdomäne der beiden Proteine wichtig. Trotz der Sequenzidentität von nur 15% ist die Architektur der MxA-Stabdomäne sehr ähnlich zu dem von Dynamin (Gao et al., 2010; Faelber et al., 2013). Daher und wegen der unumstrittenen und sehr ausführlich beschriebenen Funktion von Dynamin bei der Abschnürung von CCVs während der Endozytose liegt die Vermutung nahe, dass Mx1 ebenfalls ein wichtiger Fissionsfaktor beim intrazellulären Transport ist. Mehrere Evidenzen unterstützen diese Vermutung und sollen im Folgenden näher beschrieben und diskutiert werden. Hinweise auf mögliche funktionelle und mechanische Eigenschaften von Mx1 ergeben sich aus strukturellen Analogien und Vergleichen zu bereits detaillierter charakterisierten Proteinen der Dynamin-Superfamilie.

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass Mx-Proteine, genau wie Dynamin, in der Lage sind Membranen *in vitro* zu tubulieren (Accola et al. 2002; Kochs et al. 2005, von der Malsburg et al., 2011). Die Lipidbindung wird dabei durch eine Schleifenregion an der Spitze der Stabdomäne vermittelt. Das Membran-Interaktionsmotiv, das aus vier Lysinen innerhalb dieser Schleifenregion besteht, tritt dabei mit der Lipid-Doppelschicht in Kontakt. Mx1 assoziiert daher bevorzugt mit negativ-geladenen Phospholipiden. Dies ist wahrscheinlich wegen der elektrostatischen Interaktion der positiv-geladenen Lysin-Reste des Membran-Interaktionsmotivs, wie es auch für klassische Dynamine gezeigt wurde, der Fall (von der Malsburg et al., 2011; Mattila et al., 2005; Ramachandran et al., 2009). Allerdings ist diese Schleifen-Region strukturlos, da sie in der Kristallstruktur nicht sichtbar ist (Gao et al., 2010, 2011). Betrachtet man sich die Anordnung der Domänen, so befindet sich die Schleifenregion interessanterweise an der gleichen Stelle wie die PH-Domäne von Dynamin oder die Paddel-artige Domäne von BDLP (engl.: *bacterial dynamin-like protein*), die für die Bindung an die Membran verantwortlich sind (Faelber et al., 2013). Die L4-Schleifenregion stellt somit das Äquivalent zur PH-Domäne dar. Angeordnet in einem Ring sind die L4-Schleife und die G-Domäne so positioniert, dass sie sich gegenüber liegen, wobei die Schleifenregion nach innen gerichtet ist. Dadurch entsteht die charakteristische T-förmige Erscheinung der membranassoziierten MxA-Oligomere. Auf diese Weise können Mx-Proteine mit Membranen oder viralen Zielstrukturen in Kontakt treten (von der Malsburg, 2011; Gao et al., 2010, 2011). Die aktuellen Daten zeigen, dass die Morphologie von membrangebundenem MxA sehr ähnlich zu membrangebundenem Dynamin ist (von der Malsburg, 2011). Außerdem konnte in Studien von Kochs und Kollegen gezeigt werden, dass sich humanes MxA reversibel in Ringen anordnet, die auch zu spiralförmigen Oligomeren umgeformt werden können (Kochs et al., 2002; von der Malsburg et al., 2011).

Tauscht man einzelne Lysine des Membran-Interaktionsmotivs durch Glutaminsäure aus, so führt dies zu einer Aufhebung der Lipidbindung. Erstaunlicherweise beeinflusst der Austausch aller vier Lysine sogar die Fähigkeit von MxA zur Selbstassemblierung (von der Malsburg, 2011). Dies spiegelt die Besonderheit der Schleifenregion bzw. des Membran-Interaktionsmotivs für die Funktion der großen GTPase wieder. Im Gegensatz dazu wird die Assoziation mit Membranen durch den Austausch des Tetrapeptid-Motivs im caninen Mx1 durch Alanine, die zu einer neutralen Ladung des Membraninteraktions-Motivs führen, nicht komplett verhindert. Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub> ist weiterhin mit vesikulären Strukturen, die gleichmäßig innerhalb der Zelle verteilt waren, assoziiert (s. Abb. 3.19.). Allerdings zeigten die Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>-positiven Kompartimente eine elongierte, tubuläre Morphologie mit einer verzögerten Fissionskinetik (s. Abb. 3.23. C). Es handelt sich dabei nicht um Aggregate, sondern um funktionale Kompartimente, denn sie zeigten eine eindeutige Assoziation mit p75<sup>NTR</sup> (s. Abb. 3.19. C). Die Veränderung in der Vesikel-Elongation konnte durch die Mikrotubuli-Depolymerisierung oder den *Knockdown* von Kif5B rückgängig gemacht werden (s. Abb. 3.19 B und D, Abb. 3.20 E). Daher ist sehr wahrscheinlich, dass die Verlängerung der Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>-positiven Strukturen mit einem Defekt in der Vesikelabschnürung korreliert. Die treibende Kraft, welche die Verlängerung der Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>-positiven Strukturen bewirkt, könnte die Bewegung von assoziiertem Kif5B entlang von Mikrotubuli sein. Tatsächlich blieb trotz Mutation im Interaktions-Motiv die Bindung zwischen Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub> und  $\alpha$ -Tubulin sowie Kif5B erhalten. Diese war allerdings im Vergleich zu Mx1-GFP abgeschwächt. Möglicherweise wirken Mx1 und Kif5B zusammen an den Abschnürungsvorgängen (s. Kapitel 4.2.3). Sehr interessant ist, dass Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub>-exprimierende MDCK-Zellen viele unbewegliche Strukturen sowie einen reduzierten anterograden Transport, welcher das Recycling und die Sekretion vorantreibt, aufwiesen (s. Abb. 3.21. A). Dies könnte mit der verringerten Assoziation von Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub> mit Kif5B zu erklären sein. Die retrograde Bewegung war allerdings nicht beeinflusst. Die Expression einer dominant-negativen Dynamin-Mutante führte ebenfalls zu einer Elongation von Endosomen, da durch die Mutation die Dynamin-abhängige Vesikelabschnürung verhindert wurde (Nicoziani et al., 2000). Diese Beobachtungen und die strukturellen Ähnlichkeiten zu Dynamin geben Grund zur Annahme, dass die Aktivität von Mx1 die Vesikelabschnürung begünstigt.

Trotzt der Assoziation mit intrazellulären Strukturen weist Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub> eine verringerte Lipid-Bindung auf. Dies macht vor allem der von Gao durchgeführte *in vitro* Bindungsassay deutlich. Der Assay zeigte, dass der humanen Variante dieser Mutante (MxA<sub>K554-557A</sub>) die Fähigkeit effizient an Lipide zu binden, fehlte (Gao, 2011). Der vorgeschlagene Grund für die verringerte Bindung an Membranen liegt in der veränderten Selbstassemblierung der MxA-Mutante, denn die L4-Schleifenregion ist

wichtig für die Oligomerisierung von Mx1 (Gao et al., 2010, 2011). Unterstützt wird diese Beobachtung von der in dieser Arbeit durchgeführten FRAP-Studie (s. Abb. 3.22. A und B). Dabei zeigte Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub> im Vergleich zu nicht-mutiertem Mx1-GFP eine deutlich veränderte Rekrutierung an intrazelluläre Membranen sowie eine veränderte Assemblierungskinetik. Zur Bildung von Dimeren, von Tetrameren und zur Oligomerisierung ordnen sich Mx1 in einem Zickzack-Muster an. Die Interaktion wird über die Stabregion vermittelt, wobei drei Interaktionsflächen (Interaktionsfläche-1, -2 und -3) dafür entscheidend sind. Interessanterweise befinden sich die L4-Schleifenregionen benachbarter Mx-Proteine in räumlicher Nähe zueinander und sind somit ebenfalls für die Interaktion wichtig. Mutationen in den vier Interaktionsflächen führten zur Aufhebung der Membranbindung. Des Weiteren wurden MxA-Mutanten, die verschiedene Mutationen in den vier Interaktionsflächen trugen, auf ihre Fähigkeit zur Selbstassemblierung getestet. Mutationen in der Interaktionsfläche-1 und -3 sowie die Deletion mehrerer Aminosäuren innerhalb der L4-Schleifenregion führten zur Bildung stabiler Dimere, die nicht weiter oligomerisieren konnten. Die Mutationen in der Interaktionsfläche-2 verhinderten vollständig die Bildung von Tetrameren und diese MxA-Mutanten lagen hauptsächlich in der monomeren Form vor. Folglich sind für die Lipidbindung MxA-Moleküle, welche die Fähigkeit zur Selbstassemblierung besitzen und intakte Interaktionsflächen sowie eine vollständige L4-Schleifenregion aufweisen, notwendig (Gao et al., 2010, 2011). Humanes MxA<sub>K554-557A</sub> bildet im Gegensatz zu nicht-mutiertem MxA stabile Dimere aus (Gao, 2011). Die veränderte Oligomerisierungskinetik nach Mutation des Membran-Interaktionsmotivs im caninen Mx1 konnte mit Hilfe von Interaktionsstudien bestätigt werden. So co-präzipitierte, im Vergleich zu nicht-mutiertem Protein, signifikant weniger endogenes Mx1 mit Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub> (s. Abb. 3.23. A und B).

Anhand der in der Literatur vorhandenen Daten ist anzunehmen, dass die Mitglieder der Dynamin-Superfamilie durch die Oligomerisierung die nötige physikalische Kraft für die Membran-Tubulierung und die Ausbildung von Vesikeln erzeugen. Im Fall von Dynamin wird die Vesikelfission nicht allein durch einzelne PH-Domänen vermittelt, denn die Affinität einer PH-Domäne an die Phospholipide ist relativ schwach. Diese wird jedoch nach Oligomerisierung zu ringförmigen und helikalen Strukturen verstärkt (Klein et al., 1998, Lee et al., 1999). Durch das Anlagern der Dynamin-Oligomere um die Lipide herum wird die Membrankrümmung stabilisiert und die Tubulierung wird ausgelöst (Praefcke & McMahon, 2004; Ramachandran et al., 2009). Die GTPase-Aktivität wird jedoch nur dann stimuliert, wenn eine komplette ringförmige Struktur aus Dynamin- bzw. Mx-Proteinen gebildet wurde (Faelber et al., 2013; Gao et al., 2010). Beispielsweise produziert die Polymerisation von Dynamin ausreichend Energie, um eine starke Membrankrümmung zu erzeugen (Roux et al., 2010).

Vor Kurzem konnte der Mechanismus, wie MxA und Dynamin die nötige Kraft zur Vesikelabschnürung induzieren, aufgeklärt werden. Durch die Anordnung in einer helikalen Struktur kontaktieren sich die GTPase-Domänen gegenüberliegender MxA/Dynamin-Moleküle. Der Kontakt der GTPase-Domänen ist transient, was eine gleichmäßige Bewegung gewährleistet. Abhängig vom gebundenen Nukleotid kann das Bündelsignalelement zusammen mit der GTPase-Domäne eine offene oder eine geschlossene Konformation einnehmen. Die Bindung von GTP aktiviert die relative Bewegung zwischen den beiden Domänen und die BSE dreht sich um  $\sim 70^\circ$  zur GTPase-Domäne, wodurch die geschlossene Konformation gebildet wird. Durch die GTP-Hydrolyse kommt es zur Änderung von der geschlossenen zur offenen Konformation, wodurch die gegenüberliegenden Proteine der Helix aneinander vorbeigezogen werden. Dies bewirkt das Zusammenziehen des MxA/Dynamin-Oligomers sowie eine Verengung der darunterliegenden Membran. Da MxA/Dynamin eine höhere Affinität für GTP und eine hohe intrinsische GTPase-Aktivität besitzt, werden die Proteine nach der Hydrolyse umgehend mit neuem GTP beladen. Infolgedessen können die gegenüberliegenden GTPase-Domänen mehrmals miteinander interagieren und aneinander vorbeigezogen werden. Dabei produzieren sie eine latitudinale Scherkraft, welche die Drehung der Protein-Helix hervorruft. Für die finale Abschnürung eines Vesikels werden axiale Kräfte erzeugt. Durch die Verengung der Helix verändert sich der Winkel zwischen den einzelnen MxA/Dynamin-Proteinen. Dadurch löst sich die BSE von der benachbarten Stabdomäne. Gleichzeitig bleiben die Stabdomänen aber miteinander assoziiert. Durch die Bewegung der BSE wird eine mechanische Kraft erzeugt, wodurch die benachbarten Windungen der Helix auseinander geschoben werden. In der GDP-gebundenen Form kommt es anschließend zur Disassemblierung des Dynamin- bzw. MxA-Oligomers (Chen et al., 2017). Somit sind neben der Membranbindung, mit Hilfe des L4-Membraninteraktions-Motivs, sowie die Fähigkeit zur Selbstassemblierung und die GTPase-Aktivität für den Wirkungsmechanismus der Dynamin-Superfamilie entscheidend. Tatsächlich weist Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub> ein weniger dynamisches Verhalten (s. Abb. 3.21. A und Abb. 3.23. C) sowie eine signifikante Reduktion der Fissions- und Fusionsereignisse auf (s. Abb. 3.21 B). Außerdem bedingt die Mutation im Membran-Interaktionsmotiv einen verminderten apikalen Transport (s. Abb. 3.23. D und E). Mx1 scheint daher, ähnlich wie klassisches Dynamin, eine wichtige Fusionskomponente im intrazellulären Transport zu sein, welche die Abschnürung von Vesikeln unterstützt. In Analogie führt eine dominant-negative Dynamin-Mutante, die einen Defekt in der GTP-Bindung und Hydrolyse aufweist, zur Inhibition der Endozytose in polaren MDCK-Zellen (Altschuler et al., 1998). Auch andere Mitglieder der Dynamin-Superfamilie haben die Fähigkeit sich in regelmäßigen

Oligomeren um Membranen herum anzuordnen. Deswegen fungieren sie als Gerüst für die Modellierung von Membranen. Neben klassischem Dynamin und Mx-Proteinen wurde diese Eigenschaft auch für DRP1 (Ingberman et al., 2005), EHD1 (Pant et al., 2009) und EHD2 (Daumke et al., 2007; Shah et al., 2014), OPA1 (Ban et al., 2010) sowie BDLP (Low et al., 2009) nachgewiesen. Die gleiche Beobachtung wurde auch für das Dynamin-ähnliche Protein Vps1 gemacht. In Hefezellen ist Vps1 das einzige Dynamin-Protein mit einer eindeutigen Funktion im vesikulären Membrantransport, (Vater et al., 1992; Wilsbach & Payne, 1993; Yu & Cai, 2004; Nannapaneni et al., 2010; Smaczynska-de Rooij et al., 2010). Vps1 enthält eine G-Domäne sowie eine Mitteldomäne. Gemeinsam mit anderen nicht-klassischen Dynaminen, besitzt das Protein keine PH-Domäne (Peplowska & Ungermann, 2005), sondern das Sequenzmotiv Insert B (van der Bliek, 1999). Genau wie Mx1, ist es an endosomalen Kompartimenten sowie an Stellen endozytotischer Prozesse lokalisiert. Außerdem ist Vps1 in der Lage Liposomen *in vitro* zu binden und diese zu tubulieren (Yu & Cai, 2004; Smaczynska-de Rooij et al., 2010; Hayden et al., 2013). Das Insert B befindet sich an der gleichen Position wie die PH-Domäne der klassischen Dynamine und wie die L4-Schleifenregion von Mx1. Diese Region ist verantwortlich für die Lipid-Bindung. Der Austausch der drei Lysine des Insert B zu Alaninen reduzierte die Interaktion mit Lipiden, vor allem mit PI(4,5)P<sub>2</sub>. Die Mutation des Insert B führte außerdem dazu, dass der Prozess der Endozytose selektiv blockiert wurde (Smaczynska-de Rooij et al., 2019). Da Vps1 trotzdem in der Lage ist, Membranen zu binden, wird vermutet, dass weitere Faktoren an der Rekrutierung von Vps1 an Membranen beteiligt sind. Beispielsweise ist das Insert B des Proteins in der Lage, die SH3-Domäne von Adapterproteinen bzw. Proteine mit einer BAR-Domäne zu binden (Yu & Cai, 2004; Smaczynska-de Rooij et al., 2012).

### 4.3. Zusammenfassung und Ausblick

Die Ausbildung und Aufrechterhaltung der epithelialen Polarität hängt von zahlreichen Faktoren ab. Der intrazelluläre Protein- und Lipidtransport ist hierfür vor allem entscheidend. Dabei handelt es sich um einen komplexen aber sehr feinregulierten und dynamischen Prozess, der essentiell für die spezifische Verteilung von Proteinen und Lipiden zu den jeweiligen Membranbereichen, Organellen und Kompartimenten ist. Die Kontrolle und Regulation des korrekten sekretorischen Transports wird von zahlreichen spezifischen Faktoren und Proteinen an den verschiedenen Stufen des intrazellulären Vesikeltransports bewerkstelligt. Die beteiligten zellulären Komponenten sind sehr vielfältig und ihre Funktion bzw. Funktionsweise ist oft noch nicht aufgeklärt. Der Ausfall eines Bestandteils der intrazellulären Sortier- und Transportmaschinerie kann die Störung dieses Systems bewirken, wodurch schwerwiegende Defekte auftreten können (Stein et al., 2002). Die Erforschung der einzelnen Schritte und Komponenten des intrazellulären Proteintransports sowie das Verständnis über den grundlegenden Mechanismus sind daher von großem wissenschaftlichem Interesse. Der apikale Proteintransport ist unerlässlich für die Aufrechterhaltung der epithelialen Polarität und hängt sowohl von der Mikrotubuli-Detyrosinierung (s. Kapitel 4.1) als auch von der Anwesenheit der großen GTPase Mx1 ab (s. Kapitel 4.2). Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese zwei unterschiedlichen Komponenten des Proteintransports untersucht, deren Verbindung der apikale Proteintransport in polaren Epithelzellen darstellt.

Eine zentrale Rolle bei der polaren Verteilung von Transportvesikeln in Epithelzellen spielt das Mikrotubuli-Zytoskelett. Dieses ist nicht nur für den Erhalt der Zellform sondern auch für die Aufrechterhaltung der intrazellulären Organisation wichtig (Burute & Kapitein, 2019). Neben den Aktin-Filamenten bilden Mikrotubuli die Grundlage des intrazellulären Transportsystems, indem sie als Transportwege zur Beförderung von Vesikelpopulationen dienen (Jacob et al., 2003; Janke & Bulinski, 2011; Gadadhar et al., 2017; Brouhard & Rice, 2018). Eine wichtige posttranslationale Modifikation im intrazellulären Transport betrifft die Detyrosinierung. Beispielsweise spielen stabile, detyrosinierte Mikrotubuli eine Rolle in der Organisation von Membranen der Recyclingkompartimente und ermöglichen den Transport zur Zelloberfläche (Lin et al., 2002). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Detyrosinierung einen direkten Einfluss auf den apikalen Proteintransport hat. So führte die Reduzierung von detyrosiniertem Tubulin durch konstante Überexpression der TTL zu einem reduzierten apikalen Proteintransport. Der basolaterale Transport blieb unbeeinflusst (Zink et al., 2012). Detyrosinierte Mikrotubuli und die Interaktion mit spezifischen Motorproteinen ermöglichen damit die gerichteten Transportvorgänge zur apikalen Plasmamembran. Vor allem das Motorprotein Kinesin-1 (Kif5A, B und C) bindet bevorzugt an detyrosiniertes

Tubulin, wodurch der Transport verschiedener Moleküle entlang spezifischer Mikrotubuli-Populationen erfolgt (Liao & Gundersen, 1998; Kreitzer et al., 1999; Lin et al., 2002; Dunn et al., 2008; Konishi & Setou, 2009). Vor allem die Kinesin-Motoren Kif5B und Kif5C sind am apikalen Transport beteiligt (Jaulin et al., 2007; Astanina & Jacob, 2010). Für den apikalen Kif5-abhängigen Proteintransport in den polaren Epithelzellen ist eine kleine Population an Mikrotubuli, die mit ihren Plus-Enden zur apikalen Domäne ausgerichtet ist, besonders wichtig. Möglicherweise sind diese Mikrotubuli posttranslational modifiziert, wodurch der apikale Proteintransport von z.B. p75<sup>NTR</sup> gesteuert und bewerkstelligt werden kann (Jaulin et al., 2007; Jacobson & Mostov, 2007). Interessanterweise konnte nach TTL-Überexpression ein dramatischer Rückgang im apikalen Proteintransport von p75<sup>NTR</sup> beobachtet werden (Zink et al., 2012). Es kann davon ausgegangen werden, dass die Reduktion der Detyrosinierung eine veränderte Motorprotein-Bindung bewirkt und dies zu einem verminderten Kif5-abhängigen Proteintransport führt. Damit werden Transportvorgängen zur apikalen Membran durch die Detyrosinierung indirekt beeinflusst, indem es die Rekrutierung von Motorproteinen reguliert.

Der aktuelle Kenntnisstand über den Einfluss und die Bedeutung der Tyrosinierung/Detyrosinierung lässt den Schluss zu, dass die Aktivität der TTL entscheidend für die Ausbildung der epithelialen Zellmorphologie ist. Ein Eingriff in den Zyklus durch Modulation der TTL-Expression bewirkte signifikante Unterschiede im Polarisationsprozess sowie in der epithelialen Morphogenese. Die TTL ist außerdem für ein reguliertes Migrationsverhalten und die Zelladhäsion der Zellen von essentieller Bedeutung. Damit könnte die TTL als wichtiger Modulator der Zelle wirken, indem es die Ausbildung der korrekten Morphogenese sowie die Motilität der Zellen beeinflusst. Viele Hinweise, wie auch die Daten dieser Arbeit, deuten darauf hin, dass der Anstieg der Detyrosinierung die Zellmigration fördert. Darüber hinaus begünstigt eine hohe Menge an detyrosiniertem Tubulin die EMT und sehr wahrscheinlich auch das Metastasierungspotenzial und die Chemoresistenz von Tumoren (Whipple et al., 2007, 2010). Eine gesteigerte Zellmigration ist ein wichtiges Merkmal des invasiven Wachstums von Tumoren. Die Zellmigration ist damit ein wichtiger therapeutischer Angriffspunkt der Tumorthherapie. Erste Hinweise deuten darauf hin, dass detyrosinierte Mikrotubuli auch für die Dynamik der fokalen Adhäsionen entscheidend sind. Die Detyrosinierung spielt vor allem bei der Wiederanheftung von zirkulierenden Tumorzellen eine wichtige Rolle (Whipple et al., 2007, 2010). Die Regulierung der Zelladhäsion durch die Detyrosinierung stellt einen weiteren Forschungsansatz dar. Daher könnten Präparate, die detyrosiniertes Tubulin reduzieren, ein vielversprechender Ansatz für die Behandlung sein (Whipple et al., 2013).

Es stellt sich jedoch die Frage, ob die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse auch auf andere epitheliale Zelllinien übertragen werden können. Daher sollten die Ergebnisse in zukünftigen Arbeiten auch in weiteren Zelllinien validiert werden. Die direkte Interaktion von detyrosiniertem Tubulin mit Vinculin, aber auch mit Paxillin, könnte mit Hilfe aufgereinigter Proteine aufgeklärt werden. Allerdings ist die direkte Interaktion aufgrund der Komplexität der fokalen Adhäsionen sehr unwahrscheinlich. Des Weiteren könnten Organkulturen zur Analyse der physiologischen Rolle der TTL dienen. Auch die Wechselwirkungen zwischen Aktin und Mikrotubuli spielen bei der Zellmigration eine entscheidende Rolle. Aus diesem Grund sind weiterführende Experimente denkbar, in denen der Einfluss der posttranslational modifizierten Mikrotubuli auf das Aktin-Zytoskelett untersucht wird. Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass Mikrotubuli an Aktin-Filamente gebunden werden und entlang dieser wachsen können (Salmon et al., 2002). Demnach werden wiederum auch die Mikrotubuli durch das Aktin-Zytoskelett beeinflusst. Wichtige Proteine dabei sind z.B. Rho GTPasen, die an der Regulation von Aktin beteiligt sind, aber auch eine wichtige Rolle in der Stabilisierung der Mikrotubuli einnehmen (Cook et al., 1998; Palazzo et al., 2001; Wen et al., 2004). So könnten auch die Auswirkungen der Rho GTPasen auf detyrosinierte Mikrotubuli analysiert werden.

Eine weitere wichtige Komponente im apikalen Proteintransport ist die große GTPase Mx1. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die funktionelle Beteiligung von Mx1 im apikalen Transportsystem nachgewiesen werden. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass Mx1 sowohl am Transport von apikalen Vesikeln als auch an der Membranmodellierung beteiligt ist (s. Abb. 4.1.).

Im intrazellulären Proteintransport muss nicht nur die Bindung von Motorproteinen an die Mikrotubuli reguliert werden, sondern auch die Assoziation von Motorproteinen an Vesikel. Inzwischen ist bekannt, dass Kinesine am jeweiligen Cargo durch Interaktionen mit verschiedenen Adapterproteinen befestigt werden (Setou et al., 2000; Nakagawa et al., 2000). Auf diese Weise ist es möglich die große Diversität sowie die unterschiedlichen Transportaufgaben der Motorproteine zu erklären (Seog et al., 2004). Auch Mx1 könnte die Rolle eines solchen Adapterproteins übernehmen. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal die Assoziation von caninem Mx1 mit dem Motorprotein Kif5B beschrieben werden. Mx1 könnte demnach als Adapterprotein fungieren, indem es die Transportkomplexe aus apikalen post-Golgi Vesikeln und Motorproteinen stabilisiert. Auf diese Weise können die Vesikel entlang von Mikrotubuli, die mit ihrem Plus-Ende zur apikalen Membran gerichtet sind, zur Plasmamembran transportiert werden. In Abwesenheit von Mx1 bindet Kif5B ineffizient an apikale Vesikel. Dies erklärt den verminderten apikalen Proteintransport nach dem *Mx1-Knockout* und die beschriebene, regulatorische Rolle von Mx1 im *Lipid Raft*-unabhängigen Transport (Hoff et al., 2014).

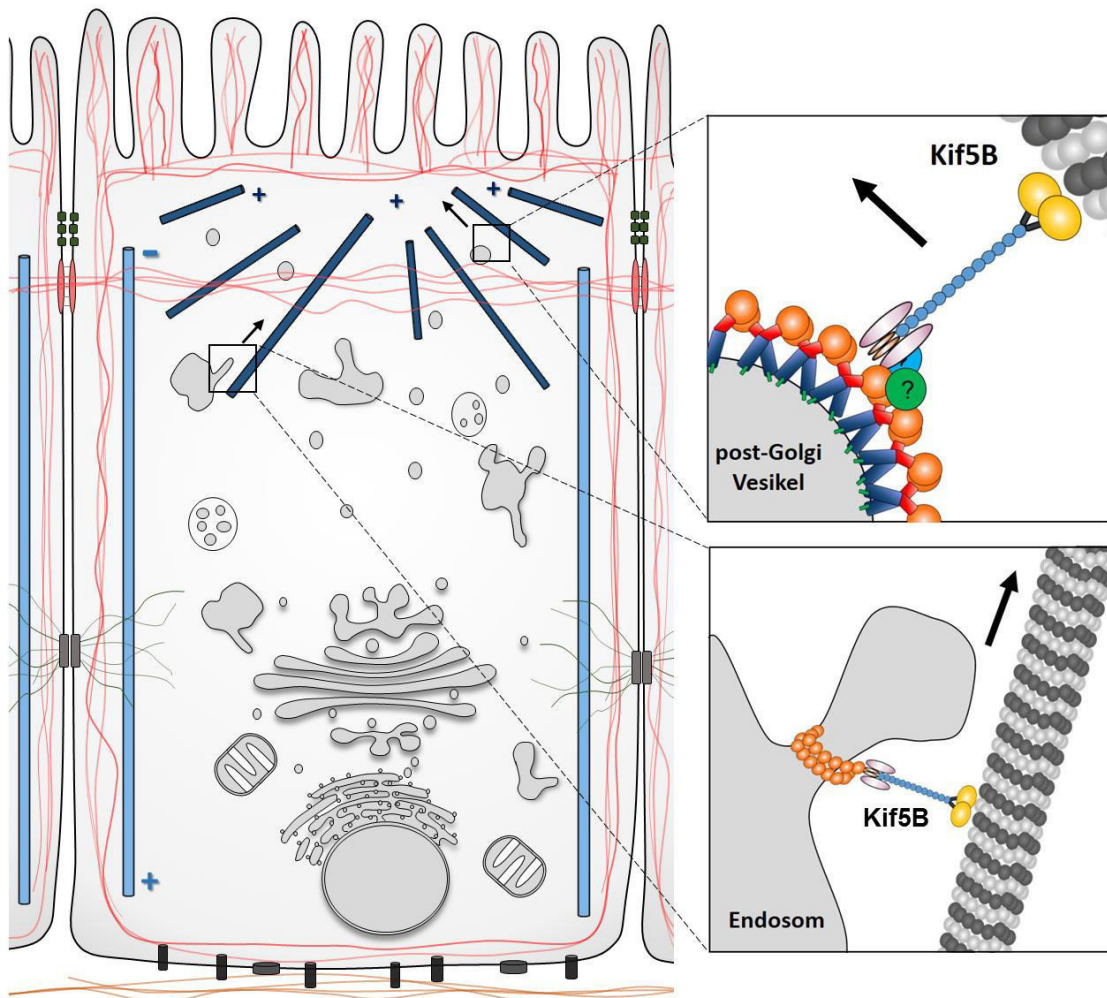


Um seine Funktionen ausüben zu können, assoziiert Mx1 mit bestimmten endosomalen Kompartimenten. Es befindet sich sowohl an Kompartimenten des frühen als auch späten sekretorischen Transportweges. Dabei wirkt Mx1 am biosynthetischen Transportweg von p75<sup>NTR</sup> (Hoff et al., 2014). Dieses Protein wird in polaren MDCK-Zellen zur apikalen Membran befördert. Dies erfolgt *Lipid Raft*-unabhängig und in Abhängigkeit von Kif5B (Jaulin et al., 2007). Außerdem beeinflusst die große GTPase den klassischen sekretorischen Transport von Clusterin/gp80 sowie die unkonventionelle Sekretion von Galektin-3, die in MDCK-Zellen wahrscheinlich exklusiv über Exosomen vermittelt wird (Hoff et al., 2014; Bänfer et al., 2018). Durch die Interaktion mit Kif5B ist Mx1 in der Lage die Assoziation von apikalen Transportvesikeln mit dem Motorprotein und den Mikrotubuli zu vermitteln. Außerdem reguliert es dadurch die Ausbildung und Stabilisierung von dynamischen Transportkomplexen. Damit fungiert Mx1 als Adapterprotein im intrazellulären Vesikeltransport und stellt einen wichtigen Bestandteil des apikalen Proteintransports dar.

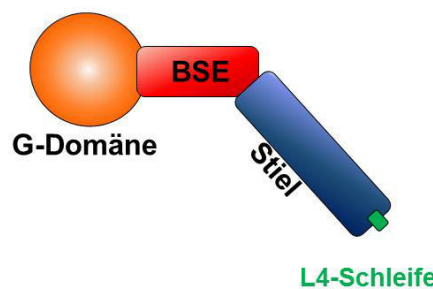
Offene Fragen ergeben sich vor allem in Hinblick auf die Interaktion mit Kif5B. Noch ist unklar, ob Mx1 direkt mit dem Motorprotein interagiert oder ob noch weitere Proteine an der Bindung von Mx1 an Kif5B beteiligt sind. Diese Frage könnte mit aufgereinigten, rekombinanten Proteinen in *in vitro Pulldown*-Experimenten aufgeklärt werden. Die Untersuchungen zur funktionellen Rolle von Mx1 deuten bereits daraufhin, dass noch weitere, nicht identifizierte Interaktionspartner der großen GTPase existieren. Diese Proteine gilt es in zukünftigen Forschungsarbeiten zu identifizieren und sie könnten der Ausgangspunkt für die weitere Aufklärung des molekularen Wirkungsmechanismus von Mx1 im intrazellulären Proteintransport sein. Die Interaktion von Mx1 mit Kif5B sowie mit möglicherweise anderen Proteinen wäre auch im Hinblick auf seine Rolle als antivirales Effektorprotein interessant, denn der genaue Mechanismus, wie die große GTPase seine antivirale Aktivität ausübt, ist bislang noch nicht komplett verstanden.

Des Weiteren scheint Mx1 in MDCK-Zellen eine wichtige Fissionskomponente im apikalen Proteintransport zu sein. Diese Schlussfolgerung konnte durch Experimente mit einer Mx1-Mutante gewonnen werden, die eine Mutation im L4-Membraninteraktions-Motiv trug. Die Fissionsrolle wurde für andere Mitglieder der Dynamin-Superfamilie ebenfalls postuliert und beschrieben. Mx1 besitzt eine hohe Strukturähnlichkeit zu Dynamin sowie einen ähnlichen Mechanismus der Selbstassemblierung (Gao et al., 2010, 2011; Faelber et al., 2013). Außerdem ist Mx1 in der Lage durch die L4-Schleifenregion mit Membranen zu assoziieren. Diese Membranbindung, welche durch das Membraninteraktions-Motiv vermittelt wird, die Fähigkeit Oligomere zu bilden als auch die GTPase-Aktivität sind unabdingbar für die Funktion von Mx1. Die GTP-

Hydrolyse bewirkt letztendlich eine starke Konformationsänderung, die als Kraftstoß für die Membranumformung benötigt wird (Chen et al., 2017).



#### Mx1 Struktur:



#### Abb. 4.1. Zusammenfassendes Modell dieser Arbeit

Mx1 stabilisiert nicht nur die Assoziation zwischen Kif5B, den Mikrotubuli und apikalen Transportvesikel sondern unterstützt auch die Vesikelfission.

## 5. Literaturverzeichnis

- Accola, M.A., Huang, B., Al Masri, A. & McNiven, M.A. (2002). The antiviral dynamin family member, MxA, tubulates lipids and localizes to the smooth endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 277, 21829-21835.
- Aillaud, C., Bosc, C., Peris, L., Bosson, A., Heemeryck, P., van Dijk, J., Le Friec, J., Boulan, B., Vossier, F., Sanman, L.E., et al. (2017). Vasohibins/SVBP are tubulin carboxypeptidases (TCPs) that regulate neuron differentiation. *Science* 358, 1448-1453.
- Aizawa, H., Sekine, Y., Takemura, R., Zhang, Z., Nangaku, M. & Hirokawa, N. (1992). Kinesin family in murine central nervous system. *J Cell Biol* 119(5), 1287-96.
- Akhmanova, A. & Maiato, H. (2017). Closing the tubulin deetyrosination cycle. *Science* 358(6369), 1381-1382.
- Akhmanova, A. & Steinmetz, M.O. (2008). Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature Rev Mol Cell Biol* 9, 309-322.
- Akhmanova, A. & Steinmetz, M.O. (2015). Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 711-726.
- Alieva, I.B., Zemskov, E.A., Kireev, I.I., Gorshkov, B.A., Wiseman, D.A., Black, S.M. & Verin, A.D. (2010). Microtubules growth rate alteration in human endothelial cells. *J Biomed Biotechnol* 2010, 671536.
- Altschuler, Y., Barbas, S.M., Terlecky, L.J., Tang, K., Hardy, S., Mostov, K.E. & Schmid, S.L. (1998). Redundant and distinct functions for dynamin-1 and dynamin-2 isoforms. *J Cell Biol* 143(7), 1871-1881.
- Amos, L. & Klug, A. (1974). Arrangement of subunits in flagellar microtubules. *J Cell Sci* 14(3), 523-49.
- Ando, D., Korabel, N., Huang, K.C. & Gopinathan, A. (2015). Cytoskeletal network morphology regulates intracellular transport dynamics. *Biophys J* 109, 1574-1582.
- Ang, A.L., Fölsch, H., Koivisto, U.M., Pypaert, M. & Mellman, I. (2003). The Rab8 GTPase selectively regulates AP-1B-dependent basolateral transport in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* 163(2), 339-50.
- Appenzeller-Herzog, C. & Hauri, H.-P. (2006). The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *J Cell Sci* 119(11), 2173-83.
- Arce, C.A., Rodriguez, J.A., Barra, H.S. & Caputo, R. (1975). Incorporation of L-tyrosine, L-phenylalanine and L-3,4-dihydroxyphenylalanine as single units into rat brain tubulin. *Eur J Biochem* 59, 145-149.
- Astanina, K. & Jacob, R. (2010). KIF5C, a kinesin motor involved in apical trafficking of MDCK cells. *Cell Mol Life Sci* 67, 1331-1342.
- Atkinson, S.J., Doberstein, S.K. & Pollard, T.D. (1992). Moving off the beaten tracks. *Curt Biol* 2, 326-328.
- Axelrod, D., Koppel, D.E., Schlessinger, J., Elson, E. & Webb, W.W. (1976). Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys J* 16, 1055-1069.
- Bacallo, R., Antony, C., Dotti, C., Karsenti, E., Stelzer, E.H. & Simons, K. (1989). The subcellular organization of Madin-Darby canine kidney cells during the formation of a polarized epithelium. *J Cell Biol* 109, 2817-2832.
- Badin-Larçon, A.C., Boscheron, C., Soleilhac, J.M., Piel, M., Mann, C., Denarier, E., Fourest-Lieuvin, A., Lafanechère, L., Bornens, M. & Job, D. (2004). Suppression of nuclear oscillations in *Saccharomyces cerevisiae* expressing Glu tubulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5577-5582.
- Bänfer, S., Schneider, D., Dewes, J., Strauss, M.T., Freibert, S.-A., Heimerl, T., Maier, U.G., Elsässer, H.-P., Jungmann, R. & Jacob, R. (2018). Molecular mechanism to recruit galectin-3 into multivesicular bodies for polarized exosomal secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, E4396-E4405.
- Baietti, M.F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P. & David, G. (2012).

- Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol* 14, 677-85.
- Ban, T., Heymann, J.A.W., Song, Z., Hinshaw, J.E. & Chan, D.C. (2010). OPA1 disease alleles causing dominant optic atrophy have defects in cardiolipin-stimulated GTP hydrolysis and membrane tubulation. *Hum Mol Genet* 19, 2113-2122.
- Bance, B., Seetharaman, S., Leduc, C., Boeda, B. & Etienne-Manneville, S. (2019). Microtubule acetylation but not detyrosination promotes focal adhesion dynamics and cell migration. *J. Cell Sci* 132(7).
- Banks, L. & Humbert, P.O. (2008). On the guardians of polarity and the disorientation of cancer. *Oncogene* 27, 6876-6877.
- Barker, G. & Simmons, N.L. (1981). Identification of two strains of cultured canine renal epithelial cells (MDCK cells) which display entirely different physiological properties. *Q Jl exp Physiol* 66, 61-72.
- Barra, H.S., Rodriguez, J.A., Arce, C.A. & Caputto, R. (1973). A soluble preparation from rat brain that incorporates into its own proteins (14 C)arginine by a ribonuclease-sensitive system and (14 C)tyrosine by a ribonuclease-insensitive system. *J Neurochem* 20(1), 97-108.
- Bartolini, F. & Gundersen, G.G. (2006). Generation of noncentrosomal microtubule arrays. *J Cell Sci* 119, 4155-4163.
- Bazzigher, L., Schwarz, A. & Staeheli, P. (1993). No enhanced influenza virus resistance of murine and avian cells expressing cloned duck Mx protein. *Virology* 195, 100-112.
- Beltramo, D.M., Arce, C.A. & Barra, H.S. (1987). Tubulin, but not microtubules, is the substrate for tubulin: tyrosine ligase in mature avian erythrocytes. *J Biol Chem* 262(32), 15673-7.
- Berezniuk, I., Vu, H.T., Lyons, P.J., Sironi, J.J., Xiao, H., Burd, B., Setou, M., Angeletti, R.H., Ikegami, K. & Fricker L.D. (2012). Cytosolic carboxypeptidase 1 is involved in processing alpha- and beta-tubulin. *J Biol Chem* 287, 6503-6517.
- Bergen, L.G. & Borisy, G.G. (1980). Head-to-tail polymerization of microtubules in vitro. Electron microscope analysis of seeded assembly. *J Cell Biol* 84, 141-150.
- Bernasconi, D., Schultz, U. & Staeheli, P. (1995). The interferon-induced Mx protein of chickens lacks antiviral activity. *J Interferon Cytokine Res* 15, 47-53.
- Bieling, P., Kandels-Lewis, S., Telley, I.A., van Dijk, J., Janke, C. & Surrey, T. (2008). CLIP-170 tracks growing microtubule ends by dynamically recognizing composite EB1/tubulin-binding sites. *J Cell Biol* 183, 1223-1233.
- Binder, L.I., Dentler, W.L. & Rosenbaum, J.L. (1975). Assembly of chick brain tubulin onto flagellar microtubules from *Chlamydomonas* and sea urchin sperm. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 72(3), 1122-1126.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res* 7, 1513-1523.
- Bloom, G.S., Wagner, M.C., Pfister, K.K. & Brady, S.T. (1988). Native structure and physical properties of bovine brain kinesin and identification of the ATP-binding subunit polypeptide. *Biochemistry* 27(9), 3409-16.
- Bonifacino, J.S. & Glick, B.S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116(2), 153-66.
- Bouchet, B.P., Gough, R.E., Ammon, Y.C., van de Willige, D., Post, H., Jacquemet, G., Altelaar, A.M., Heck, A.J., Goult, B.T. & Akhmanova, A. (2016). Talin-KANK1 interaction controls the recruitment of cortical microtubule stabilizing complexes to focal adhesions. *Elife* 5, e18124.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. & McCormick, F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348(6297), 125-32.
- Bradke, F. & Dotti, C.G. (1999). The role of local actin instability in axon formation. *Science* 283, 1931-34.
- Brady, S.T. (1985). A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor. *Nature* 317, 73-75.

- Brangwynne, C.P., MacKintosh, F.C. & Weitz, D.A. (2007). Force fluctuations and polymerization dynamics of intracellular microtubules. *P Natl Acad Sci U S A* 104, 16128-33.
- Bravo-Cordero, J.J., Hodgson, L. & Condeelis, J. (2012). Directed cell invasion and migration during metastasis. *Curr Opin Cell Biol* 24, 277-83.
- Bré, M.H., Kreis, T.E. & Karsenti, E. (1987). Control of microtubule nucleation and stability in Madin-Darby canine kidney cells: The occurrence of noncentrosomal, stable detyrosinated microtubules. *J Cell Biol* 105, 1283-1296.
- Bré, M.H., Pepperkok, R., Hill, A.M., Levilliers, N., Ansorge, W., Stelzer, E.H. & Karsenti, E. (1990). Regulation of microtubule dynamics and nucleation during polarization in MDCK II cells. *J Cell Biol* 111, 3013-21.
- Bré, M.H., Pepperkok, R., Kreis, T.E. & Karsenti, E. (1991). Cellular interactions and tubulin detyrosination in fibroblastic and epithelial cells. *Biol Cell* 71, 149-160.
- Bretscher, M.S. & Aguado-Velasco, C. (1998). Membrane traffic during cell locomotion. *Curr Opin Cell Biol* 10, 537-41.
- Brouhard, G.J. & Rice, L.M. (2018). Microtubule dynamics: an interplay of biochemistry and mechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19(7), 451- 463.
- Brouhard, G. & Sept, D. (2012). Microtubules: Sizing up the GTP Cap. *Curr Biol* 22(18), R802-R803.
- Brown, S.G., Knowell, A.E., Hunt, A., Patel, D., Bhosle, S. & Chaudhary, J. (2015). Interferon inducible antiviral MxA is inversely associated with prostate cancer and regulates cell cycle, invasion and Docetaxel induced apoptosis. *Prostate* 75(3), 266-279.
- Brown, D.A. & Rose, J.K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68, 533-544.
- Brown, P.S., Wang, E., Aroeti, B., Chapin, S.J., Mostov, K.E. & Dunn, K.W. (2000). Definition of distinct compartments in polarized Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells for membrane-volume sorting, polarized sorting and apical recycling. *Traffic* 1, 124-140.
- Bryant, D.M. & Mostov, K. E. (2008). From cells to organs: building polarized tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(11), 887-901.
- Bulinski, J.C. & Gundersen, G.G. (1991). Stabilization of post-translational modification of microtubules during cellular morphogenesis. *Bioessays* 13, 285-93.
- Bulinski, J. C., Richards, J.E. & Piperno, G. (1988). Posttranslational modifications of  $\alpha$ -tubulin: Detyrosination and acetylation differentiate populations of interphase microtubules in cultured cells. *J Cell Biol* 106, 1213-12.
- Burgo, A. Proux-Gillardeaux, V., Sotirakis, E., Bun, P., Casano, A., Verraes, A., Liem, R.K., Formstecher, E., Coppey-Moisán, M. & Galli, T. (2012). A molecular network for the transport of the TI-VAMP/VAMP7 vesicles from cell center to periphery. *Dev Cell* 23, 166-180.
- Burnette, W.N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112, 195-203.
- Burute, M. & Kapitein, L.C. (2019). Cellular Logistics: Unraveling the Interplay Between Microtubule Organization and Intracellular Transport. *Annu Rev Cell Dev Biol* 35, 29-54.
- Cao, X., Coskun, Ü., Rössle, M., Buschhorn, S.B., Grzybek, M., Dafforn, T.R., Lenoir, M., Overduin, M. & Simons, K. (2009). Golgi protein FAPP2 tubulates membranes. *PNAS* 106 (50) 21121-21125.
- Cao, H., Garcia, F. & McNiven, M.A. (1998). Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 9, 2595-609.
- Cao, H., Thompson, H.M., Krueger, E.W. & McNiven, M.A. (2000). Disruption of Golgi structure and function in mammalian cells expressing a mutant dynamin. *J Cell Sci* 113, 1993-2002.

- Carlier, M.F. & Pantaloni, D. (1981). Kinetic analysis of guanosine 5'-triphosphate hydrolysis associated with tubulin polymerization. *Biochemistry* 20, 1918-1924.
- Carmosino, M., Valenti, G., Caplan, M. & Svelto, M. (2010). Polarized traffic towards the cell surface: how to find the route. *Biol Cell* 102, 75-91.
- Caron, J.M. (1997). Posttranslational modification of tubulin by palmitoylation: I. In vivo and cell-free studies. *Mol Biol Cell*, 8(4), 621–636.
- Castro-Castro, A., Janke, C., Montagnac, G., Paul-Gilloteaux, P. & Chavrier, P. (2012). ATAT1/MEC-17 acetyltransferase and HDAC6 deacetylase control abalance of acetylation of alpha-tubulin and cortactin and regulate MT1-MMP trafficking and breast tumor cell invasion. *Eur J Cell Biol* 91, 950-960.
- Cereijido, M., Robbins, E., Dolan, W., Rotunno, C. & Sabatini, D. (1978). Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J Cell Biol* 77(3), 853-80.
- Chang, W., Webster, D.R., Salam, A.A., Gruber, D., Prasad, A., Eiserich, J.P. & Bulinski, J.C. (2002). Alteration of the C-terminal amino acid of tubulin specifically inhibits myogenic differentiation. *J Biol Chem* 277, 30690-30698.
- Chappie, J.S., Acharya, S., Leonard, M., Schmid, S.L. & Dyda, F. (2010). G domain dimerization controls dynamin's assembly-stimulated GTPase activity. *Nature* 465(7297), 435-40.
- Chappie, J.S., Acharya, S., Liu, Y.W., Leonard, M., Pucadyil, T.J. & Schmid, S.L. (2009). An intramolecular signaling element that modulates dynamin function in vitro and in vivo. *Mol Biol Cell* 20(15), 3561-71.
- Chappie J.S. & Dyda, F. (2013). Building a fission machine – structural insights into dynamin assembly and activation. *J Cell Sci* 126(13), 2773-2784.
- Chavent, M., Duncan, A.L., Rassam, P., Oliver Birkholz, O., Hélie, J., Reddy, T., Beliaev, D., Hambly, B., Piehler, J., Kleanthous, C. & Mark S. P. Sansom M.S.P. (2018). How nanoscale protein interactions determine the mesoscale dynamic organisation of bacterial outer membrane proteins. *Nat Commun* 9(1), 2846.
- Chen, M.S., Obar, R.A., Schroeder, C.C., Austin, T.W., Poodry, C.A., Wadsworth, S.C. & Vallee, R.B. (1991). Multiple forms of dynamin are encoded by shibire, a Drosophila gene involved in endocytosis. *Nature* 351, 583-6.
- Chen, Y., Zhang, L., Graf, L., Yu, B., Liu, Y., Kochs, G. Zhao, Y. & Gao, S. (2017) Conformational dynamics of dynamin-like MxA revealed by single-molecule FRET. *Nat Commun* 8, 15744.
- Chua, J., Rikhy, R. & Lippincott-Schwartz, J. (2009). Dynamin 2 orchestrates the global actomyosin cytoskeleton for epithelial maintenance and apical constriction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(49), 20770-5.
- Chuang, J.Z. & Sung, C.H. (1998). The cytoplasmic tail of rhodopsin acts as a novel apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* 142, 1245-1256.
- Collins, C. A. (1994). Dynein-based organelle movement. In: Hyams JS, Lloyd CW (eds) *Microtubules*. John Wiley, Chichester, 367-380.
- Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30, 255-89.
- Cook, T. A., Nagasaki, T. & Gundersen, G. G. (1988). Rho guanosine triphosphatase mediates the selective stabilization of microtubules induced by lysophosphatidic acid. *J. Cell Biol* 141, 175-18.
- Corbeel, L. & Freson, K. (2008). Rab proteins and Rab-associated proteins: major actors in the mechanism of protein-trafficking disorders. *Eur J Pediatr* 167(7), 723-729.
- Cui, J., Li, X., Duan, Z., Xue, W., Wang, Z., Lu, S. Lin, R., Liu, M., Zhu, G. & Huang, J.-D. (2015). Analysis of Kif5b expression during mouse kidney development. *Plos One* 10, e0126002.
- Cramm-Behrens, C.I., Dienst, M. & Jacob, R. (2008). Apical cargo traverses endosomal compartments on the passage to the cell surface. *Traffic*, 9, 2206-20.
- Danino, D. & Hinshaw, J.E. (2001). Dynamin family of mechanoenzymes. *Curr Opin Cell Biol* 13, 454-460.

- Daumke, O., Lundmark, R., Vallis, Y., Martens, S., Butler, P.J. & McMahon, H.T. (2007). Architectural and mechanistic insights into an EHD ATPase involved in membrane remodelling. *Nature* 449, 923-927.
- Daumke, O. & Praefcke, G.J. (2016). Invited review: Mechanisms of GTP hydrolysis and conformational transitions in the dynamin superfamily. *Biopolymers* 105, 580-593.
- Davis, D., Yuan, H., Yang, Y.M., Liang, F.X. & Sehgal, P.B. (2019). Interferon- $\alpha$ -induced cytoplasmic MxA structures in hepatoma Huh7 and primary endothelial cells. *Contemp Oncol (Pozn)* 22(2), 86-94.
- Davis, D., Yuan, H., Liang, F.X., Yang, Y.M., Westley, J., Petzold, C., Dancel-Manning, K., Deng, Y., Sall, J. & Sehgal, P.B. (2019). Human antiviral protein MxA forms novel metastable membrane-less cytoplasmic condensates exhibiting rapid reversible “crowding”-driven phase transitions. *J Virol pii: JVI.01014-19*.
- Delacour, D., Cramm-Behrens, C.I., Drobecq, H., Le Bivic, A., Naim, H.Y. & Jacob, R. (2006). Requirement for galectin-3 in apical protein sorting. *Curr Biol*, 16, 408-14.
- Delacour, D., Greb, C., Koch, A., Salomonsson, E., Leffler, H., Bivic, A.L. & Jacob, R. (2007). Apical sorting by galectin-3-dependent glycoprotein clustering. *Traffic* 8, 379-88.
- Delacour, D. & Jacob, R. (2006). Apical protein transport. *Cell Mol Life Sci* 63, 2491-2505.
- Desai, A. & Mitchison, T.J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 83-117.
- Dick, A., Graf, L., Olal, D., von der Malsburg, A., Gao, S., Kochs, G. & Daumke, O. (2015). Role of nucleotide binding and GTPase domain dimerization in dynamin-like myxovirus resistance protein A for GTPase activation and antiviral activity. *J Biol Chem* 290, 12779-12792.
- Dogterom, M. & Yurke, B. (1997). Measurement of the force–velocity relation for growing microtubules. *Science* 278, 856-860.
- Doherty, G. & McMahon, H. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* 78, 857-902.
- Dukes, J.D., Whitley, P. & Chalmers, A.D. (2011). The MDCK variety pack: choosing the right strain. *BMC Cell Biol* 12, 43
- Dunn, S., Morrison, E.E., Liverpool, T.B., Molina-Paris, C., Cross, R.A., Alonso, M.C. & Peckham, M. (2008). Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. *J Cell Sci* 121, 1085-1095.
- Dunton, T.A., Goose, J.E., Gavaghan, D.J., Sansom, M.S.P. & Osborne, J.M. (2014). The free energy landscape of dimerization of a membrane protein, NanC PLoS Comput Biol 10, e1003417.
- Eddé, B., Rossier, J., Le Caer, J.P., Desbruyères, E., Gros, F. & Denoulet, P. (1990). Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin. *Science* 247, 83-85.
- Eipper, B.A. (1972). Rat Brain Microtubule Protein: Purification and Determination of Covalently Bound Phosphate and Carbohydrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69(8), 2283-2287.
- Elkin, S.R., Lakoduk, A.M. & Schmid, S.L. (2016). Endocytic pathways and endosomal trafficking: a primer. *Wien Med Wochenschr* 166(7-8), 196-204.
- Endow, S.A., Kull, F.J. & Liu, H. (2010). Kinesins at a glance. *J Cell Sci* 123, 3420-3424.
- Erck, C., Peris, L., Andrieux, A., Meissirel, C., Gruber, A.D., Vernet, M., Schweitzer, A., Saoudi, Y., Pointu, H., Bosc, C., Salin, P. A., Job, D. & Wehland, J. (2005). A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7853-7858.
- Erickson, H.P. & O'Brien, E.T. (1992). Microtubule dynamic instability and GTP hydrolysis. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 21, 145-66.
- Etienne-Manneville, S. (2013). Microtubules in cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 29, 471-499.
- Etienne-Manneville, S. (2004). Actin and Microtubules in Cell Motility: Which One is in Control? *Traffic* 5, 470-477.

- Evans, L., Mitchison, T. & Kirschner, M. (1985). Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. *J Cell Biol* 100(4), 1185-91.
- Ezratty, E.J., Bertaux, C., Marcantonio, E.E. & Gundersen, G.G. (2009). Clathrin mediates integrin endocytosis for focal adhesion disassembly in migrating cells. *J Cell Biol* 187, 733-747.
- Faelber, K. & Daumke, O. (2018). Struktur und Funktion des mechanochemischen Motorproteins Dynamin. *Biospektrum* 24, 481.
- Faelber, K., Gao, S., Held, M., Posor, Y., Haucke, V., Noé, F. & Daumke, O. (2013). Oligomerization of dynamin superfamily proteins in health and disease. *Prog Mol Biol Transl Sci* 117, 411-443.
- Faelber, K., Held, M., Gao, S., Posor, Y., Haucke, V., Noé F. & Daumke O. (2012). Structural insights into dynamin-mediated membrane fission. *Structure* 20, 1621-28.
- Faelber, K., Posor, Y., Gao, S., Held, M., Roske, Y., Schulze, D., Haucke, V., Noe, F. & Daumke, O. (2011). Crystal structure of nucleotide-free dynamin. *Nature* 477, 556–560.
- Faust, F., Gomez-Lazaro, M., Borta, H., Agricola, B. & Schrader, M. (2008). Rab8 is involved in zymogen granule formation in pancreatic acinar AR42J cells. *Traffic* 9, 964-79.
- Ferguson, S.M. & De Camilli, P. (2012). Dynamin, a membrane remodelling GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(2), 75–88.
- Friedl, P. & Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 445–57.
- Fristrom, D. (1988). The cellular basis of epithelial morphogenesis. A review. *Tissue Cell* 20(5), 645-90.
- Ford, M.G., Jenni, S. & Nunnari, J. (2011). The crystal structure of dynamin. *Nature* 477, 561-566.
- Gadadhar, S., Bodakuntla, S., Natarajan, K. & Janke, C. (2017). The tubulin code at a glance. *J Cell Sci* 130, 1347-1353.
- Gagnon, J.A. & Mowry, K.L. (2011). Molecular motors: directing traffic during RNA localization. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 46, 229-239.
- Gao, S. (2011). Structural and functional study of human MxA Protein. Dissertation Freien Universität Berlin.
- Gao, S., von Der Malsburg, A., Dick, A., Faelber, K., Schröder, G.F., Haller, O., Kochs, G. & Daumke, O. (2011). Structure of myxovirus resistance protein A reveals intra-and intermolecular domain interactions required for the antiviral function. *Immunity* 35, 514-25.
- Gao, S., von Der Malsburg, A., Paeschke, S., Behlke, J., Haller, O., Kochs, G. & Daumke, O. (2010). Structural basis of oligomerization in the stalk region of dynamin-like MxA. *Nature* 465, 502-6.
- Gerdes, J.M. & Katsanis, N. (2005). Microtubule transport defects in neurological and ciliary disease. *Cell Mol Life Sci* 62, 1556-1570.
- Geuens, G., Gundersen, G.G., Nuydens, R., Cornelissen, F., Bulinski, J.C. & DeBrabander, M. (1986). Ultrastructural colocalization of tyrosinated and detyrosinated  $\alpha$ -tubulin in interphase and mitotic cells. *J Cell Biol* 103, 1883-1893.
- Giepman, B.N. & van Ijzendoorn, S.C. (2009). Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains. *Biochim Biophys Acta* 1788(4), 820-31.
- Gissen, P. & Maher, E.R. (2007). Cargos and genes: insights into vesicular transport from inherited human disease. *J Med Genet* 44(9), 545-555.
- Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175-182.
- Glymph, S., Mandal, S., Knowell, A.E., Abebe, F., & Chaudhary, J. (2013). The myxovirus resistance A (MxA) gene -88G>T single nucleotide polymorphism is associated with prostate cancer. *Infect Genet Evol*, 16, 186-190.
- Goldstein, L.S. (2001). Kinesin molecular motors: transport pathways, receptors, and human disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6999-7003.



- González-Jamett, A.M., Momboisse, F., Haro-Acuña, V., Bevilacqua, J.H., Caviedes, P. & Cárdenas, A.M. (2013). Dynamin-2 function and dysfunction along the secretory pathway. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4, 126.
- Goodson, H. & Jonasson, E. (2018). Microtubules and microtubule-associated proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10, Article a030288.
- Goose, J.E. & Sansom, M.S.P. (2013). Reduced lateral mobility of lipids and proteins in crowded membranes. *PLoS Comput. Biol* 9, e1003033.
- Greb, C. (2011). Proteinkomponenten und Transportwege an der apikalen Membran polarer Epithelzellen Marburg: Dissertation Philipps-Universität Marburg.
- Green, I.J. (1962). Serial propagation of influenza B (Lee) virus in a transmissible line of canine kidney cells. *Science* 138, 42-43.
- Griffiths, G., Pfeiffer, S., Simons, K. & Marlin, K. (1985). Exit of newly synthesized membrane proteins from the trans cisterna of the Golgi complex to the plasma membrane. *J Cell Biol* 101, 949-963.
- Griffiths, G. & Simons, K. (1986). The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* 234, 438-443.
- Grigliatti, T.A., L. Hall, Rosenbluth, R. & Suzuki, D.T. (1973). Temperature-sensitive mutations in *Drosophila melanogaster*. XIV. A selection of immobile adults. *Mol Gen Genet* 120 (2), 107-14.
- Grigoriev, I., Splinter, D., Keijzer, N., Wulf, P., Demmers, J., Ohtsuka, T., Modesti, M., Maly, I., Grosveld, F., Hoogenraad, C. & Akhmanova, A. (2007). Rab6 regulates transport and targeting of exocytotic carriers. *Dev Cell* 13, 305-314.
- Gu, Z., Noss, E.H., Hsu, V.W. & Brenner, M.B. (2011). Integrins traffic rapidly via circular dorsal ruffles and macropinocytosis during stimulated cell migration. *J Cell Biol* 193, 61-70.
- Gudkov, A.V., Kazarov, A.R., Thimmapaya, R., Axenovich, S.A., Mazo, I.A. & Roninson, I. B. (1994). Cloning mammalian genes by expression selection of genetic suppressor elements: association of kinesin with drug resistance and cell immortalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 26; 91(9), 3744-8.
- Gundersen, G.G. & Bulinski, J.C. (1986). Distribution of tyrosinated and nontyrosinated  $\alpha$ -tubulin during mitosis. *J Cell Biol* 102, 1118-1126.
- Gundersen, G.G. & Bulinski, J.C. (1988). Selective stabilization of microtubules oriented toward the direction of cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5946-50.
- Gundersen G.G., Kalnoski, M.H. & Bulinski, J.C. (1984). Distinct populations of microtubules: tyrosinated and nontyrosinated alpha tubulin are distributed differently in vivo. *Cell* 38, 779-789.
- Gundersen, G.G., Khawaja, S. & Bulinski, J.C. (1987). Postpolymerization detyrosination of  $\alpha$ -tubulin: a mechanism for subcellular differentiation of microtubules. *J Cell Biol* 105, 251-264.
- Gupta, V., Palmer, K.J., Spence, P., Hudson, A. & Stephens, D.J. (2008). Kinesin-1 (uKHC/KIF5B) is Required for Bidirectional Motility of ER Exit Sites and Efficient ER-to-Golgi Transport. *Traffic* 9, 1850-1866.
- Hallak, M.E., Rodriguez, J.A., Barra, H.S. & Caputto, R. (1977). Release of tyrosine from tyrosinated tubulin. Some common factors that affect this process and the assembly of tubulin. *FEBS Lett* 73, 147-150.
- Haller, O., Acklin, M. & Staeheli, P. (1987). Influenza virus resistance of wild mice: wild-type and mutant Mx alleles occur at comparable frequencies. *J Interferon Res* 7(5), 647-56.
- Haller, O., Arnheiter, H., Gresser, I. & Lindenmann, J. (1979). Genetically determined, interferon-dependent resistance to influenza virus in mice. *J Exp Med*, 149, 601-12.
- Haller, O., Gao, S., Malsburg von der, A., Daumke, O. & Kochs, G. (2010). Dynamin-like MxA GTPase: structural insights into oligomerization and implications for antiviral activity. *J Biol Chem* 285(37), 28419-24.
- Haller, O. & Kochs, G. (2002). Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic* 3, 710-7.

- Haller, O. & Kochs, G. (2011). Human MxA protein: an interferon-induced dynamin-like GTPases with broad antiviral activity. *J Interferon Cytokine Res* 31, 79-87.
- Haller, O., Staeheli, P. & Kochs, G. (2007b). Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie* 89, 812-818.
- Haller, O., Staeheli, P., Schwemmle, M. & Kochs, G. (2015). Mx GTPases: dynamin-like antiviral machines of innate immunity. *Trends Microbiol*, 23, 154-63.
- Haller, O., Stertz, S. & Kochs, G. (2007a). The Mx GTPase family of interferon-induced antiviral proteins. *Microbes Infect* 9, 1636-43.
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Ramers, C., Bajjana Songa, E., Bendahman, N. & Hamers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363, 446-48.
- Hammond J.W., Cai D. & Verhey K.J. (2008). Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr Opin Cell Biol* 20, 71-76.
- Hartsock, A. & Nelson, W.J. (2008). Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1778(3), 660-669.
- Hauri H.-P., Kappeler F., Andersson H. & Appenzeller C. (2000). ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. *J. Cell Sci* 113, 587-596.
- Hayden, J., Williams, M., Granich, A., Ahn, H., Tenay, B., Lukehart, J., Highfill, C., Dobard, S. & Kim, K. (2013). Vps1 in the late endosome-to-vacuole traffic. *J Biosci* 38(1), 73-83.
- Hell, S.W. & Wichmann, J. (1994). Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett* 19, 780-782.
- Henley, J.R., Krueger, E.W., Oswald, B.J. & McNiven, M.A. (1998). Dynamin-mediated Internalization of caveolae. *J Cell Biol* 141, 85-9910.
- Herrmann, H. & Aebi, U. (2000). Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol* 12, 79-90.
- Herrmann, J.M. & Spang, A. (2015). Intracellular parcel service: current issues in intracellular membrane trafficking. *Methods Mol Biol* 1270, 1-12.
- Herskovits, J.S., Burgess, C.C., Obar, R.A. & Vallee, R.B. (1993). Effects of mutant rat dynamin on endocytosis. *J Cell Biol.* 122, 565-578.
- Hessvik, N.P. & Llorente, A. (2017). Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci* 75, 193-208.
- Hinshaw, J.E. & Schmid, S.L. (1995). Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* 374,190-92.
- Hirokawa, N., Niwa, S. & Tanaka, Y. (2010). Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron* 68, 610-638.
- Hirokawa, N. & Noda, Y. (2008). Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics. *Physiol Rev* 88, 1089-1118.
- Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y. & Niwa, S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 682-696.
- Hönig, E., Ringer, K., Dewes, J., von Mach, T., Kamm, N., Kreitzer, G., & Jacob, R. (2018). Galectin-3 modulates the polarized surface delivery of  $\beta$ 1-integrin in epithelial cells. *J Cell Sci*, 131(11).
- Hönig, E., Schneider, K. & Jacob, R. (2015). Recycling of galectin-3 in epithelial cells. *Eur J Cell Biol* 94(7-9), 309-15.
- Hoff, F. (2015). Charakterisierung der großen GTPase Myxovirus Resistance Protein 1 (Mx1) im intrazellulären Proteintransport. Dissertation Philipps-Universität Marburg.
- Hoff, F., Greb, C., Hollmann, C., Hönig, E. & Jacob R. (2014). The large GTPase Mx1 is involved in apical transport in MDCK cells. *Traffic*, 15(9), 983-96.
- Holy, T.E. & Leibler, S. (1994). Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search in space. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5682-85.
- Horisberger, M.A. (1992). Interferon-induced human protein MxA is a GTPase which binds transiently to cellular proteins. *J Virol*, 66, 4705-9.

- Howard, J. & Hyman, A.A. (2003). Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* 422, 753-758.
- Howard, J. & Hyman, A.A. (2007). Microtubule polymerases and depolymerases. *Curr Opin Cell Biol* 19, 31-5.
- Hu, J.L., Hua, Y.J., Chen, Y., Yu, B., & Gao, S. (2015). Structural analysis of tumor-related single amino acid mutations in human MxA protein. *Chinese journal of cancer* 34(12), 583-593.
- Hua, W., Sheff, D., Toomre, D. & Mellman, I. (2006). Vectorial insertion of apical and basolateral membrane proteins in polarized epithelial cells revealed by quantitative 3D live cell imaging. *J Cell Biol* 172, 1035-1044.
- Huber, L.A., De Hoop, M.J., Dupree, P., Zerial, M., Simons, K. & Dotti, C.G. (1993a). Protein transport to the dendritic plasma membrane of cultured neurons is regulated by rab8p. *J Cell Biol* 123, 47-55.
- Huber, L.A., Pimplikar, S., Parton, R.G., Virta, H., Zerial, M. & Simons, K. (1993b). Rab8, a small GTPase involved in vesicular traffic between the TGN and the basolateral plasma membrane. *J Cell Biol* 123, 35-45.
- Huber, L.A., Dupree, P. & Dotti, C.G. (1995). A deficiency of small GTPase rab8 inhibits membrane traffic in developing neurons. *Mol Cell Biol* 15, 918-924.
- Hutagalung, A.H. & Novick, P.J. (2011). Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell. *Physiol Rev* 91(1), 119-149.
- Iida-Norita, R., Kawamura, M., Suzuki, Y., Hamada, S., Masamune, A., Furukawa, T. & Sato, Y. (2019). Vasohibin-2 plays an essential role in metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci* 110(7), 2296-2308.
- Ingerman, E., Perkins, E.M., Marino, M., Mears, J.A., McCaffery, J.M., Hinshaw, J.E., & Nunnari, J. (2005). Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol* 170, 1021-1027.
- Inoué, S. & Salmon, E.D. (1995). Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements. *Mol Biol Cell* 6, 1619-40.
- Jacob, R., Heine, M., Alfalah, M. & Naim, H.Y. (2003). Distinct cytoskeletal tracks direct individual vesicle populations to the apical membrane of epithelial cells. *Curr Biol* 13, 607-612.
- Jacob, R. & Naim, H.Y. (2001). Apical membrane proteins are transported in distinct vesicular carriers. *Curr Biol* 11, 1444-50.
- Jacobson, C. & Mostov, K. (2007). Catch the KIF5B train to the apical surface. *Dev Cell* 13(4), 457-458.
- Janke, C. (2014). The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, and functions. *J Cell Biol* 206, 461-472.
- Janke, C. & Bulinski, J.C. (2011). Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 773-786.
- Janke, C. & Kneussel, M. (2010). Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends Neurosci* 33(8), 362-372.
- Jatiani, S. S. & Mittal, R. (2004). Expression of the antiviral protein MxA in cells transiently perturbs endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 323, 541-6.
- Jaulin, F., Xue, X., Rodriguez-Boulant, E. & Kreitzer, G. (2007). Polarization-dependent selective transport to the apical membrane by KIF5B in MDCK cells. *Dev Cell* 13, 511-22.
- Javanainen, M., Hammaren, H., Monticelli, L., Jeon, J.H., Miettinen, M.S., Martinez-Seara, H., Metzler, R. & Vattulainen, I. (2013). Anomalous and normal diffusion of proteins and lipids in crowded lipid membranes. *Faraday Discuss* 161, 397-417.
- Johnston, S.C., Lin, K.L., Connor, J.H., Ruthel, G., Goff, A. & Hensley L.E. (2012). In vitro inhibition of monkeypox virus production and spread by Interferon- $\beta$ . *Virology* 439, 5.
- Jonusaite, S., Donini, A. & Kelly, S.P. (2016). Occluding junctions of invertebrate epithelia. *J Comp Physiol B* 186(1), 17-43.

- Kaiser, F., Kaufmann, S.H.E. & Zerrahn, J. (2004). IIGP, a member of the IFN inducible and microbial defense mediating 47 kDa GTPase family, interacts with the microtubule binding protein hook3. *J Cell Sci* 117, 1747-1756.
- Kamal, A. & Goldstein, L.S. (2002). Principles of cargo attachment to cytoplasmic motor proteins. *Curr Opin Cell Biol* 14, 63–68.
- Kanai, Y., Okada, Y., Tanaka, Y., Harada, A., Terada, S. & Hirokawa, N. (2000). KIF5C, a novel neuronal kinesin enriched in motor neurons. *J Neurosci* 1 20(17), 6374-84.
- Kaul, N., Soppina, V. & Verhey, K.J. (2014). Effects of alpha-Tubulin K40 acetylation and detyrosination on kinesin-1 motility in a purified system. *Biophys J* 106, 2636-2643.
- Kaverina, I., Rottner, K. & Small, J.V. (1998). Targeting, capture, and stabilization of microtubules at early focal adhesions. *J Cell Biol* 142, 181-90.
- Kaverina, I., Krylyshkina, O. & Small, J.V. (1999). Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J Cell Biol* 146, 1033-44.
- Keating, T.J. & Borisy, G.G. (1999). Centrosomal and non-centrosomal microtubules. *Biol Cell* 91, 321-329.
- Keller, P., Toomre, D., Diaz, E., White, J. & Simons, K. (2001). Multicolour imaging of post-Golgi sorting and trafficking in live cells. *Nat Cell Biol* 3, 140-14.
- Khawaja, S., Gundersen, G.G. & Bulinski, J.C. (1988). Enhanced stability of microtubules enriched in detyrosinated tubulin is not a direct function of detyrosination level. *J Cell Biol* 106, 141-149.
- Kim, B.H., Shenoy, A.R., Kumar, P., Bradfield, C.J. & MacMicking, J.D. (2012). IFN-inducible GTPases in host cell defense. *Cell Host Microbe* 12, 432-444.
- King, M.C., Raposo, G. & Lemmon, M.A. (2004). Inhibition of nuclear import and cell-cycle progression by mutated forms of the dynamin-like GTPase MxB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8957-62.
- Kirchhausen, T. (2002). Clathrin adaptors really adapt. *Cell* 109(4), 413-6.
- Klar, T.A., Jakobs, S., Dyba, M., Egner, A. & Hell, S.W. (2000). Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 8206-8210.
- Klein D.E., Lee A., Frank D.W., Marks M.S. & Lemmon M.A. (1998). The pleckstrin homology domains of dynamin isoforms require oligomerization for high affinity phosphoinositide binding. *J Biol Chem* 273, 27725-27733.
- Kochs, G., Haener, M., Aebi, U. & Haller, O. (2002). Self-assembly of human MxA GTPase into highly ordered dynamin-like oligomers. *J Biol Chem* 277(16), 14172-6.
- Kochs, G., Reichelt, M., Danino, D., Hinshaw, J.E. & Haller, O. (2005). Assay and functional analysis of dynamin-like Mx proteins. *Methods Enzymol* 404, 632-43.
- Koenig, J.H. & Ikeda, K. (1989). Disappearance and reformation of synaptic vesicle membrane upon transmitter release observed under reversible blockage of membrane retrieval. *J Neurosci* 9, 3844-3860.
- Konishi, Y. & Setou, M. (2009). Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. *Nature Neurosci* 12, 559–567.
- Kosaka, T. & Ikeda, K. (1983). Possible temperature-dependent blockage of synaptic vesicle recycling induced by a single gene mutation in *Drosophila*. *J Neurobiol* 14, 207-25.
- Kreis, T.E. (1987). Microtubules containing detyrosinated tubulin are less dynamic. *EMBO J* 6, 2597-2606.
- Kreitzer, G., Liao, G. & Gundersen, G.G. (1999). Detyrosination of tubulin regulates the interaction of intermediate filaments with microtubules in vivo via a kinesin-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 10, 1105-18.
- Kreitzer, G., Marmorstein, A., Okamoto, P., Vallee, R. & Rodriguez-Boulan, E. (2000). Kinesin and dynamin are required for post-Golgi transport of a plasma membrane protein. *Nat Cell Biol* 2, 125-7.
- Krylyshkina, O., Anderson, K.I., Kaverina, I., Upmann, I., Manstein, D.J. Small, J.V. & Toomre, D.K. (2003). Nanometer targeting of microtubules to focal adhesions. *J Cell Biol* 161, 853-59.

- Kuliawat, R. & Arvan, P. (1992). Protein targeting via the "constitutive-like" secretory pathway in isolated pancreatic islets: passive sorting in the immature granule compartment. *J Cell Biol* 118, 521-529.
- Kusumi, A., Suzuki, K.G.N., Kasai, R.S., Ritchie, K. & Fujiwara, T.K. (2011). Hierarchical mesoscale domain organization of the plasma membrane. *Trends Biochem Sci* 36, 604-615.
- Kuznetsov, S.A., Langford, G.M. & Weiss, D.G. (1992). Actin-dependent organelle movement in squid axoplasm. *Nature* 356, 722-725.
- Laan, L., Husson, J., Munteanu, E.L., Kerssemakers, J.W. & Dogterom, M. (2008). Force-generation and dynamic instability of microtubule bundles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 8920-25.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227,680-5.
- Lafanechere, L., Courtay-Cahen, C., Kawakami, T., Jacrot, M., Rudiger, M., Wehland, J., Job, D. & Margolis, R.L. (1998). Suppression of tubulin tyrosine ligase during tumor growth. *J Cell Sci* 111(2), 171-181.
- Lakamper, S. & Meyhofer, E. (2006). Back on track – On the role of the microtubule for kinesin motility and cellular function. *J Muscle Res Cell Motil* 27, 161-71.
- Langford, G.M. (1995). Actin- and microtubule-dependent organelle motors: interrelationships between the two motility systems. *Curr Opin Cell Biol* 7(1), 82-8.
- Lawrence, C.J., Dawe, R.K., Christie, K.R., Cleveland, D.W., Dawson, S.C., Endow, S. A., Goldstein, L.S., Goodson, H.V., Hirokawa, N., Howard, J. et al. (2004). A standardized kinesin nomenclature. *J Cell Biol.*167, 19-22.
- Lee, A., Frank, D.W., Marks, M.S. & Lemmon, M.A. (1999). Dominant-negative inhibition of receptor-mediated endocytosis by a dynamin-1 mutant with a defective pleckstrin homology domain. *Curr Biol* 9, 261-64.
- L'Hernault, S.W. & Rosenbaum, J.L. (1985). Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-aminogroup of a lysine. *Biochemistry* 24, 473-478.
- Liao, G. & Gundersen, G.G. (1998). Kinesin is a candidate for cross-bridging microtubules and intermediate filaments. Selective binding of kinesin to deetyrosinated tubulin and vimentin. *J Biol Chem* 273, 9797-9803.
- Lin, S.X., Gundersen, G.G. & Maxfield F.R. (2002). Export from pericentriolar endocytic recycling compartment to cell surface depends on stable, deetyrosinated (glu) microtubules and kinesin. *Mol Biol Cell* 13, 96-109.
- Lindenmann, J. (1962). Resistance of mice to mouse-adapted influenza A virus. *Virology* 16, 203-4.
- Lindenmann, J. (1964). Inheritance of Resistance to Influenza Virus in Mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 116, 506-9.
- Lindstedt, R., Apodaca, G., Barondes, S., Mostov, K. & Leffler, H. (1993). Apical secretion of a cytosolic protein by Madin-Darby canine kidney cells. Evidence for polarized release of an endogenous lectin by a nonclassical secretory pathway. *J Biol Chem* 268, 11750-7.
- Lippincott-Schwartz, J., Cole, N.B., Marotta, A., Conrad, P.A. & Bloom, G.S. (1995). Kinesin is the motor for microtubule-mediated Golgi-to-ER membrane traffic. *J Cell Biol* 128(3), 293-306.
- Lisanti, M., Sargiacomo, M., Graeve, L., Saltiel, A. & Rodriguez-Boulant, E. (1988). Polarized apical distribution of glycosyl phosphatidylinositol anchored proteins in a renal epithelial line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(24), 9557-9561.
- Low, H.H., Sachse, C., Amos, L.A. & Löwe, J. (2009). Structure of a bacterial dynamin-like protein lipid tube provides a mechanism for assembly and membrane curving. *Cell* 139, 1342-1352.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-75.

- Ma, S.L., Huang, W., Tang, N.L.S. & Lam, L.C.W. (2012). MxA polymorphisms are associated with risk and age-at-onset in Alzheimer disease and accelerated cognitive decline in Chinese elders. *Rejuvenation Res* 15, 516-522.
- MacMicking, J.D. (2004). IFN-inducible GTPases and immunity to intracellular pathogens. *Trends Immunol* 11, 601-609.
- MacMicking, J.D. (2012). Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nature Rev Immunol* 12, 367-382.
- Magiera, M.M. & Janke, C. (2014). Post-translational modifications of tubulin. *Curr Biol* 24, R351-R354.
- Maples, C.J., Ruiz, W.G. & Apodaca, G. (1997). Both microtubules and actin filaments are required for efficient postendocytotic traffic of the polymeric immunoglobulin receptor in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 272, 6741-6751.
- Marcos, S., Moreau, J., Backer, S., Job, D., Andrieux, A. & Bloch-Gallego, E. (2009). Tubulin tyrosination is required for the proper organization and pathfinding of the growth cone. *PLoS ONE* 4, e5405.
- Marks, B., Stowell, M.H., Vallis, Y., Mills, I.G., Gibson, A., Hopkins, C.R. & McMahon, H.T. (2001). GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature* 410: 231-235.
- Marrink, S.J. & Tieleman, D.P. (2013). Perspective on the Martini model. *Chem Soc Rev* 42, 6801-6822.
- Martin-Belmonte, F. & Perez-Moreno, M. (2012). Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nature Rev Cancer* 12, 23-38.
- Marzolo, M.P., Yuseff, M.I., Retamal, C., Donoso, M., Ezquer, F., Farfan, P., Li, Y. & Bu, G. (2003). Differential distribution of low-density lipoprotein-receptor-related protein (LRP) and megalin in polarized epithelial cells is determined by their cytoplasmic domains. *Traffic* 4, 273-288.
- Marx, A., Hoenger, A. & Mandelkow, E. (2009). Structures of kinesin motor proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* 66, 958-966.
- Matlin, K.S. & Simons, K. (1984). Sorting of an apical plasma membrane glycoprotein occurs before it reaches the cell surface in cultured epithelial cells. *J Cell Biol* 99, 2131-2139.
- Matsuzaki, F., Shirane, M., Matsumoto, M. & Nakayama, K.I. (2011) Protrudin serves as an adaptor molecule that connects KIF5 and its cargoes in vesicular transport during process formation. *Mol Biol Cell* 22(23), 4602-4620.
- Matter, K. & Mellman, I. (1994). Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol* 6, 545-554.
- Mattila, J.P., Shnyrova, A.V., Sundborger, A.C., Hortelano, E.R., Fuhrmans, M., Neumann, S., Muller, M., Hinshaw, J.E., Schmid, S.L. & Frolov, V.A. (2005). A hemifission intermediate links two mechanistically distinct stages of membrane fission. *Nature* 524, 109-113.
- Mayor, R. & Etienne-Manneville, S. (2016). The front and rear of collective cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 97-109.
- Mays, R.W., Siemers, K.A., Fritz, B.A., Lowe, A.W., van Meer, G. & Nelson, W.J., (1995). Hierarchy of mechanisms involved in generating Na/K-ATPase polarity in MDCK epithelial cells. *J Cell Biol*, 130, 1105-15.
- McMahon, H. T. & Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(8), 517-33.
- McMahon, H.T. & Boucrot, E. (2015). Membrane curvature at a glance. *J Cell Sci* 128(6), 1 065-70.
- Meads, T. & Schroer, T.A. (1995). Polarity and nucleation of microtubules in polarized epithelial cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 32, 273-288.
- Melén, K., Keskinen, P., Ronni, T., Sareneva, T., Lounatmaa, K. & Julkunen, I. (1996). Human Mx2 protein, an interferon-alpha-inducible GTPase, contains a nuclear targeting signal and is localized in the heterochromatin region beneath the nuclear envelope. *J Biol Chem* 271, 23478-2348.

- Mellman, I. & Nelson, W.J. (2008). Coordinated protein sorting, targeting and distribution in polarized cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(11), 833-845.
- Mejillano, M.R., Shivanna, B.D. & Himes, R.H. (1996). Studies on the nocodazole-induced GTPase activity of tubulin. *Arch Biochem Biophys* 336, 130-138.
- Miller, P.M., Folkmann, A.W., Maia, A.R., Efimova, N., Efimov, A. & Kaverina, I. (2009). Golgi-derived CLASP-dependent microtubules control Golgi organization and polarized trafficking in motile cells. *Nat Cell Biol* 11, 1069-80.
- Misek, D.E., Bard, E. & Rodriguez-Boulán, E. (1984). Biogenesis of epithelial cell polarity: intracellular sorting and vectorial exocytosis of an apical plasma membrane glycoprotein. *Cell* 39, 537-546.
- Misfeldt, D., Hamamoto, S. & Pitelka, D. (1976). Transepithelial transport in cell culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(4), 1212-6.
- Mitchison, T.J. & Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237-242.
- Mollinedo, F. & Gajate, C. (2015). Lipid rafts as major platforms for signaling regulation in cancer. *Adv Biol Regul* 57, 130-146.
- Montagnac, G., Meas-Yedid, V., Irondelle, M., Castro-Castro, A., Franco, M., Shida, T., Nachury, M. V., Benmerah, A., Olivo-Marin, J.-C. & Chavrier, P. (2013).  $\alpha$ TAT1 catalyses microtubule acetylation at clathrin-coated pits. *Nature* 502, 567-570.
- Moritz, M., Braunfeld, M.B., Sedat, J.W., Alberts, B. & Agard, D.A. (1995). Microtubule nucleation by  $\gamma$ -tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature* 378(6557), 638-640.
- Mostov, K.E., Verges, M. & Altschuler, Y. (2000). Membrane traffic in polarized epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol* 12, 483-490.
- Muhlberg, A.B., Warnock, D.E. & Schmid, S.L. (1997). Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase. *EMBO J* 16, 6676-6683.
- Müsch, A. (2004). Microtubule organization and function in epithelial cells. *Traffic* 5(1), 1-9.
- Mushinski, J.F., Nguyen, P., Stevens, L.M., Khanna, C., Lee, S., Chung, E.J., Lee, M.-J., Kim, Y.S., Linehan, W.M., Horisberger, M.A. & Trepel, J.B. (2009). Inhibition of tumor cell motility by the interferon-inducible GTPase MxA. *J Biol Chem* 284(22), 15206-15214.
- Murofushi, H. (1980). Purification and characterization of tubulin-tyrosine ligase from porcine brain. *J Biochem* 87(3), 979-984.
- Muroyama, A. & Lechler, T (2017). Microtubule organization, dynamics and functions in differentiated cells. *Development* 2017 144, 3012-3021.
- Nakagawa, T., Setou, M., Seog, D., Ogasawara, K., Dohmae, N., Takio, K. & Hirokawa, N. (2000). A novel motor, KIF13A, transports mannose-6-phosphate receptor to plasma membrane through direct interaction with AP-1 complex. *Cell* 103(4), 569-81.
- Nagasaki, T., Chapin, C.J. & Gundersen, G. G. (1992). Distribution of deetyrosinated microtubules in motile NRK fibroblasts is rapidly altered upon cell-cell contact: implications for contact inhibition of locomotion. *Cell Motil Cytoskeleton* 23, 45-60.
- Nakamura, T., Asano, A., Okano, S., Ko, J.-H., Kon, Y., Watanabe, T. & Agui, T. (2005). Intracellular localization and antiviral property of canine Mx proteins. *J. Interferon Cytokine Res* 25, 169-173.
- Nakayama, M., Yazaki, K., Kusano, A., Nagata, K., Hanai, N. & Ishihama, A. (1993). Structure of mouse Mxl protein. *J Biol Chem* 268, 15033-15038.
- Nannapaneni, S., Wang, D., Jain, S., Schroeder, B., Highfill, C., Reustle, L., Pittsley D, Maysent, A., Moulder, S., McDowell, R. & Kim, K. (2010). The yeast dynamin-like protein Vps1: vps1 mutations perturb the internalization and the motility of endocytic vesicles and endosomes via disorganization of the actin cytoskeleton. *Eur J Cell Biol* 89(7), 499-508.
- Netherton, C.L., Simpson, J., Haller, O., Wileman, T.E., Takamatsu, H.H., Monaghan, P. & Taylor, G. (2009). Inhibition of a large double-stranded DNA virus by MxA protein. *J Virol* 83, 2310-2320.

- Nicoziani, P., Vilhardt, F., Llorente, A., Hilout, L., Courtoy, P. J., Sandvig, K., & van Deurs, B. (2000). Role for dynamin in late endosome dynamics and trafficking of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *Mol Biol Cell* 11(2), 481-495.
- Niemann, H.H., Knetsch, M.L., Scherer, A., Manstein, D.J. & Kull, F.J. (2001). Crystal structure of a dynamin GTPase domain in both nucleotide-free and GDP-bound forms. *EMBO J.* 20(21), 5813-21.
- Nieuwenhuis, J. & Brummelkamp, T.R. (2019). The tubulin detyrosination cycle: function and enzymes. *Trends Cell Biol* 29, 80-92.
- Nieuwenhuis, J., Adamopoulos, A., Bleijerveld, O.B., Mazouzi, A., Stickel, E., Celie, P., Altelaar, M., Knipscheer, P., Perrakis, A., Blomen, V.A. & Brummelkamp, T.R. (2017). Vasohibins encode tubulin detyrosinating activity. *Science* 358, 1453-1456.
- Noda, Y., Okada, Y., Saito, N., Setou, M., Xu, Y, Zhang, Z. & Hirokawa, N. (2001). KIFC3, a microtubule minus end-directed motor for the apical transport of annexin XIIIb-associated Triton-insoluble membranes. *J Cell Biol* 155, 77-88.
- Nordmann, A., Wixler, L., Boergeling, Y., Wixler, V. & Ludwig, S. (2012). A new splice variant of the human Guanylate-Binding Protein 3 mediates anti-influenza activity through inhibition of viral transcription and replication. *Faseb J* 26, 1290-1300.
- Noteborn, M., Arnheiter, H., Richter-Mann, L., Browning, H. & Weissmann, C. (1987). Transport of the murine Mx protein into the nucleus is dependent on a basic carboxy-terminal sequence. *J Interferon Res* 7, 657-669.
- Numajiri, H.A., Naito, T., Nishie, T., Saito, S. & Nagata, K. (2011). Interferon-inducible antiviral protein MxA enhances cell death triggered by endoplasmic reticulum stress. *J Interferon Cytokine Res* 31, 847-856.
- Obar, R.A., Collins, C.A. Hammarback, J.A., Shpetner, H.S. & Vallee, R.B. (1990). Molecular cloning of the microtubule-associated mechanochemical enzyme dynamin reveals homology with a new family of GTP-binding proteins. *Nature* 347(6290), 256-61.
- Old, R.W. & Primrose, S.B. (1980). "Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering, University of California Press.
- Olenick, M.A. & Holzbaur, E.L.F (2019). Dynein activators and adaptors at a glance. *J Cell Biol* 132: jcs227132.
- Osmani, N., Peglion, F., Chavrier, P. & Etienne-Manneville, S. (2010). Cdc42 localization and cell polarity depend on membrane traffic. *J Cell Biol* 191, 1261-69.
- Ott, T. L., Yin, J., Wiley, A. A., Kim, H. T., Gerami-Naini, B., Spencer, T. E., Bartol, F. F., Burghardt, R. C. & Bazer, F. W. (1998). Effects of the estrous cycle and early pregnancy on uterine expression of Mx protein in sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction* 59, 784-794.
- Pagano, J.S. & Vaheri, A. (1965). Enhancement of infectivity of poliovirus RNA with diethylaminoethyl-dextran. *Arch Ges Virus-forsch* 17(3-4), 456-64.
- Paladino, S., Pocard, T., Catino, M. & Zurzolo, C. (2006). Gpi-anchored proteins are directly targeted to the apical surface in fully polarized MDCK cells. *J Cell Biol* 172(7), 1023-34.
- Paladino, S., Sarnataro, D., Pillich, R., Tivodar, S., Nitsch, L. & Zurzolo, C. (2004). Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins. *J Cell Biol* 167, 699-709.
- Palamidessi, A., Frittoli, E., Garré, M., Faretta, M., Mione, M. Testa, I., Diaspro, A., Lanzetti, L., Scita, G. & Di Fiore, P.P. (2008). Endocytic trafficking of Rac is required for the spatial restriction of signaling in cell migration. *Cell* 134, 135-47.
- Palazzo, A.F., Cook, T.A., Alberts, A.S. & Gundersen, G.G. (2001). mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol*, 3, 723-9.
- Palm, M., Garigliany, M.M., Cornet, F. & Desmecht, D. (2010). Interferon-induced Sus scrofa Mx1 blocks endocytic traffic of incoming influenza A virus particles. *Vet Res* 41, 29.
- Pant, S., Sharma, M., Patel, K., Caplan, S., Carr, C.M. & Grant, B.D. (2009). AMPH-1/Amphiphysin/Bin1 functions with RME-1/Ehd1 in endocytic recycling. *Nat Cell Biol* 11, 1399-1410.



- Parczyk, K., & Kondor-Koch, C. (1989). The influence of pH on the vesicular traffic to the surface of the polarized epithelial cell, MDCK. *Eur J Cell Biol* 48, 353-359.
- Paturle, L., Wehland, J., Margolis, R.L. & Job, D. (1989). Complete separation of tyrosinated, detyrosinated, and nontyrosinated brain tubulin subpopulations using affinity chromatography. *Biochemistry* 21, 2698-2704.
- Paturle-Lafanechère, L., Eddé, B., Denoulet, P., Van Dorsselaer, A., Mazarguil, H., Le Caer, J.P., Wehland, J. & Job, D. (1991). Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated. *Biochemistry* 30(43), 10523-8.
- Paturle-Lafanechere, L., Manier, M., Trigault, N., Pirollet, F., Mazarguil, H. & Job D. (1994). Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. *J Cell Sci* 107, 1529-1543.
- Pepperkok, R., Bre, M.H., Davoust, J & Kreis, T.E. (1990). Microtubules are stabilized in confluent epithelial cells but not in fibroblasts. *J Cell Biol* 111, 3003-3012.
- Peris, L., Thery, M., Fauré, J., Saoudi, Y., Lafanechère, L., Chilton, J.K., Gordon-Weeks, P., Galjart, N., Bornens, M., Wordeman, L., et al. (2006). Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J Cell Biol* 174, 839-849.
- Peris, L., Wagenbach, M., Lafanechere, L., Brocard, J., Moore, A.T., Kozielski, F., Job, D., Wordeman, L. & Andrieux, A. (2009). Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *J Cell Biol* 185, 1159-66.
- Pfeffer, S.R. (2007). Unsolved mysteries in membrane traffic. *Annu Rev Biochem* 76, 629-45.
- Piperno, G., LeDizet, M. & Chang, X.J. (1987). Microtubules containing acetylated  $\alpha$ -tubulin in mammalian cells in culture. *J Cell Biol* 104, 289-302.
- Pitossi, F., Blank, A., Schröder, A., Schwarz, A., Hüssi, P., Schwemmle, M., Pavlovic, J. & Staeheli, P. (1993). A functional GTP-binding motif is necessary for antiviral activity of Mx proteins. *Journal of Virology* 67, 6726-6732.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L. & Mullins, R.D. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29, 545-76.
- Pollard, T.D. & Borisy, G. G (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112(4), 453-65.
- Popa, S.J., Stewart, S. & Moreau, K. (2018). Unconventional secretion of annexins and galectins. *Semin Cell Dev Biol* 83:42-50.
- Praefcke, G.J.K. & McMahon, H.T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nature Reviews. Mol Cell Biol* 5(2), 133-147.
- Prakash, B., Praefcke, G.J., Renault, L., Wittinghofer, A. & Herrmann, C. (2000). Structure of human guanylate-binding protein 1 representing a unique class of GTP-binding proteins. *Nature*, 403, 567-71.
- Presley, J.F., Cole, N.B., Schroer, T.A., Hirschberg, K., Zaal, K.J. & Lippincott-Schwartz, J. (1997). ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 389, 81-85.
- Prota, A.E., Magiera, M.M., Kuijpers, M., Bargsten, K., Frey, D., Wieser, M., Jaussi, R., Hoogenraad, C.C., Kammerer, R.A., Janke, C. & Steinmetz, M.O. (2013). Structural basis of tubulin tyrosination by tubulin tyrosine ligase. *J Cell Biol* 200; 259-270.
- Quinones, G.B., Danowski, B.A., Devaraj, A., Singh, V. & Ligon, L.A. (2011). The posttranslational modification of tubulin undergoes a switch from detyrosination to acetylation as epithelial cells become polarized. *Mol Biol Cell* 22, 1045-1057.
- Racicot, K. & Ott, T. (2011). The myxovirus resistance protein, MX1, interacts with tubulin beta in uterine glandular epithelial cells. *Am J Reprod Immunol* 65, 44-53.
- Racicot, K., Schmitt, A. & Ott, T. (2012). The myxovirus-resistance protein, MX1, is a component of exosomes secreted by uterine epithelial cells. *Am J Reprod Immunol* 67, 498-505.
- Ramachandran, R., Pucadyil, T. J., Liu, Y.W., Acharya, S., Leonard, M., Lukiyanchuk, V. & Schmid, S.L. (2009). Membrane insertion of the pleckstrin homology domain

- variable loop 1 is critical for dynamin-catalyzed vesicle scission. *Mol Biol Cell* 20(22), 4630-9.
- Ramachandran, R. & Schmid, S.L. (2018). The dynamin superfamily. *Curr Biol* 28, R411-R416.
- Raposo, G. & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*, 200, 373-383.
- Redeker, V., Levilliers, N., Schmitter, J. M., Le Caer, J. P., Rossier, J., Adoutte, A. & Bré, M. H. (1994). Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules. *Science* 266, 1688-1691.
- Redeker, V., Melki, R., Promé, D., Le Caer, J. P. & Rossier, J. (1992). Structure of tubulin C-terminal domain obtained by subtilisin treatment. The major alpha and beta tubulin isotypes from pig brain are glutamylated. *FEBS Lett* 313(2), 185-192.
- Reed, N.A., Cai, D., Blasius, T.L., Jih, G.T., Meyhofer, E., Gaertig, J. & Verhey, K.J. (2006). Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol* 16(21), 2166-72.
- Reichelt, M., Stertz, S., Krijnse-Locker, J., Haller, O. & Kochs, G. (2004). Missorting of LaCrosse virus nucleocapsid protein by the interferon-induced MxA GTPase involves smooth ER membranes. *Traffic* 5,772-84.
- Peplowska, K. & Ungermann, C. (2005). Expanding dynamin: from fission to fusion. *Nat Cell Biol* 7(2), 103-4.
- Reubold, T.F., Faelber, K., Plattner, N., Posor, Y., Ketel, K., Curth, U., Schlegel, J., Anand, R., Manstein, D.J., Noé, F., Haucke, V., Daumke, O. & Eschenburg, S. (2015). Crystal structure of the dynamin tetramer. *Nature* 525(7569), 404-8.
- Richardson J.C.W., Scalera V. & Simmons N.L. (1981). Identification of two strains of MDCK cells which resemble separate nephron tubule segments. *Biochim Biophys Acta* 673, 26-36.
- Rid, R., Schiefermeier, N., Grigoriev, I., Small, J.V. & Kaverina, I. (2005). The last but not the least: the origin and significance of trailing adhesions in fibroblastic cells. *Cell Motil Cytoskelet* 61, 161-71.
- Rindler, M.J., Ivanov, I.E., Plesken, H., Rodriguez-Boulan, E. & Sabatini, D.D. (1984). Viral glycoproteins destined for apical or basolateral plasma membrane domains traverse the same Golgi apparatus during their intracellular transport in doubly infected Madin–Darby canine kidney cells. *J Cell Biol.* 98, 1304-1319.
- Ringer, K., Riehl, J., Müller, M., Dewes, J., Hoff, F. & Jacob, R. (2018). The large GTPase Mx1 binds Kif5B for cargo transport along microtubules. *Traffic* 19(12), 947-964.
- Rinnerthaler, G., Geiger, B. & Small, J.V. (1988). Contact formation during fibroblast locomotion: involvement of membrane ruffles and microtubules. *J Cell Biol* 106, 747-60.
- Robinson, M.S., Sahlender, D.A. & Foster, S.D. (2010). Rapid inactivation of proteins by rapamycin-induced rerouting to mitochondria. *Dev Cell* 18(2), 324-31.
- Rodriguez, L.G., Wu, X. & Guan, J.-L. (2005) Wound-healing assay. *Methods Mol Biol* 294, 23-29.
- Rodriguez-Boulan, E., Kreitzer, G. & Müsch, A., (2005). Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 233-47.
- Rodriguez-Boulan, E. & Macara, I.G. (2014). Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(4), 225-242.
- Rodriguez-Boulan, E., Paskiet, K.T., Salas, P.J. & Bard, E. (1984). Intracellular transport of influenza virus hemagglutinin to the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* 98, 308-319.
- Roignot, J., Peng, X. & Mostov, K. (2013). Polarity in Mammalian Epithelial Morphogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, 5(2).
- Rogalski, A.A. & Singer, S.J. (1984). Association of elements of the Golgi apparatus with microtubules. *J Cell Biol* 99, 1092-1100.

- Rosas-Acosta, G., Russell, W.K., Deyrieux, A., Russell, D.H. & van Wilson, G. (2005). A universal strategy for proteomic studies of SUMO and other ubiquitin-like modifiers. *Mol Cell Proteomics* 4(1), 56-72.
- Ross, M.H. & Pawlina, W., (2011). *Histology a text and atlas; with correlated cell and molecular biology*, 6. ed. Philadelphia, Pa., Kluwer.
- Roux, A., Koster, G., Lenz, M., Sorre, B., Manneville, JB., Nassoy, P. & Bassereau, P. (2010). Membrane curvature controls dynamin polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 4141-46.
- Roux, A., Uyhazi, K., Frost, A. & De Camilli, P. (2006). GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature* 441(7092), 528-31.
- Royer, C. & Lu, X. (2011). Epithelial cell polarity: a major gatekeeper against cancer? *Cell Death Differ* 18(9), 1470-7.
- Rüdiger, M., Wehland, J. & Weber, K. (1994). The carboxy-terminal peptide of detyrosinated  $\alpha$  tubulin provides a minimal system to study the substrate specificity of tubulin-tyrosine ligase. *Eur J Biochem* 220, 309-320.
- Saka, S.K., Honigsmann, A., Eggeling, C., Hell, S.W., Lang, T. & Rizzoli, S.O. (2014). Multi-protein assemblies underlie the mesoscale organization of the plasma membrane. *Nat Commun* 5, 4509.
- Salaycik, K.J., Fagerstrom, C.J., Murthy, K., Tulu, U.S. & Wadsworth, P. (2005). Quantification of microtubule nucleation, growth and dynamics in wound-edge cells. *J Cell Sci* 118, 4113-4122.
- Salmon, W. C., Adams, M. C., & Waterman-Storer, C. M. (2002). Dual-wavelength fluorescent speckle microscopy reveals coupling of microtubule and actin movements in migrating cells. *J. Cell Biol.* 158, 31-37.
- Sandrock, M., Frese, M., Haller, O. & Kochs, G. (2001). Interferon-induced rat Mx proteins confer resistance to rift valley fever virus and other arthropod-borne viruses. *J Interferon Cytokine Res* 21, 663-668.
- Saraste, J. & Marie, M. (2018). Intermediate compartment (IC): from pre-Golgi vacuoles to a semi-autonomous membrane system. *Histochem Cell Biol* 150(5), 407-430.
- Sato, A., Akitsu, M., Amano, Y., Yamashita, K., Ide, M., Shimada, K., Yamashita, A., Hirano, H., Arakawa, N., Maki, T., Hayashi, I., Ohno, S. & Suzuki, A. (2013). The novel PAR-1-binding protein MTCL1 has crucial roles in organizing microtubules in polarizing epithelial cells. *J Cell Sci* 126, 4671-4683.
- Sato, T., Iwano, T., Kunii, M., Matsuda, S., Mizuguchi, R., Jung, Y., Hagiwara, H., Yoshihara, Y., Yuzaki, M., Harada, R. & Harada, A. (2014). Rab8a and Rab8b are essential for several apical transport pathways but insufficient for ciliogenesis. *J Cell Sci* 127(2), 422-31.
- Sato, T., Mushiake, S., Kato, Y., Sato, K., Sato, M., Takeda, N., Ozono, K., Miki, K., Kubo, Y., Tsuji, A., Harada, R. & Harada, A. (2007). The Rab8 GTPase regulates apical protein localization in intestinal cells. *Nature* 448(7151), 366-9.
- Schatten, H. & Sun, Q.Y. (2014). Posttranslationally modified tubulins and other cytoskeletal proteins: their role in gametogenesis, oocyte maturation, fertilization and Pre-implantation embryo development. *Adv Exp Med Biol* 759, 57-87.
- Scheiffele, P., Peranen, J. & Simons, K. (1995). N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature* 378, 96-98.
- Schmid, S.L. & Frolov, V.A. (2011). Dynamin: Functional Design of a Membrane Fission Catalyst. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 79-105.
- Schroer, T.A. (2000). Motors, clutches and brakes for membrane traffic: a commemorative review in honor of Thomas Kreis. *Traffic* 1(1):3-10.
- Schröder, H.C., Wehland, J. & Weber, K. (1985) Purification of brain tubulin-tyrosine ligase by biochemical and immunological methods. *J Cell Biol* 100, 276-281.
- Schulze, E., Asai, D.J., Bulinski, J.C. & Kirschner, M. (1987). Posttranslational modification and microtubule stability. *J Cell Biol* 105, 2167-2177.
- Schwartz, S, L., Cao, C., Pylypenko, O., Rak, A. & Wandinger-Ness, A. (2007). Rab GTPases at a glance. *J Cell Sci* 120, 3905-3910.

- Schweizer, A., Fransen, J.A.M., Bächli, T., Ginsel, L. & Hauri, H.-P. (1988). Identification, by a monoclonal antibody, of a 53-kD protein associated with a tubular-vesicular compartment at the *cis*-side of the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 107, 1643-1653.
- Seitz, C., Frensing, T., Hoper, D., Kochs, G. & Reichl, U. (2010). High yields of influenza A virus in Madin-Darby canine kidney cells are promoted by an insufficient interferon-induced antiviral state. *J Gen Virol* 91, 1754-1763.
- Seog, D., Lee, D. & Lee, S. (2004). Molecular Motor Proteins of the Kinesin Superfamily Proteins (KIFs): Structure, Cargo and Disease. *J Korean Med Sci* 19(1), 1–7.
- Setou M., Nakagawa T., Seog D. H. & Hirokawa N. (2000). Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science* 288(5472), 1796-1802.
- Sever, S., Muhlberg, A.B. & Schmid, S.L. (1999). Impairment of Dynamin's GAP Domain Stimulates Receptor-Mediated Endocytosis. *Nature* 398(6727), 481-86.
- Shah, C., Hegde, B.G., Moren, B., Behrmann, E., Mielke, T., Moenke, G., Spahn, C.M., Lundmark, R., Daumke, O. & Langen, R. (2014). Structural insights into membraneinteraction and caveolar targeting of dynamin-like EHD2. *Structure* 22, 409-420.
- Shpetner, H.S. & Vallee, R.B. (1989). Identification of dynamin, anovel mechanochemical enzyme that mediates interactionsbetween microtubules. *Cell* 59, 421-432.
- Simon, J.P., Ivanov, I.E., Shopsin, B., Hersh, D., Adesnik, M. & Sabatini, D.D. (1996). The in vitro generation of post-Golgi vesicles carrying viral envelope glycoprotein requires an ARF-like GTP-binding protein and a protein kinase C associated with the Golgi apparatus. *J Biol Chem* 271, 16952-16961.
- Simons, K. & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- Simons, K. & Wandinger-Ness, A. (1990). Polarized sorting in epithelia. *Cell* 62: 207-210.
- Simons, K. & van Meer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27(17), 6197-202.
- Sirajuddin, M., Rice, L.M. & Vale, R.D. (2014). Regulation of microtubule motors by tubulin isoforms and post-translational modifications. *Nat Cell Biol* 16, 335-344.
- Smaczynska-de Rooij, I.I., Allwood, E.G., Aghamohammadzadeh, S., Hettema, E.H., Goldberg, M.W. & Ayscough, K.R. (2010). A role for the dynamin-like protein Vps1 during endocytosis in yeast. *J Cell Sci* 123(20), 3496-506.
- Smaczynska-de Rooij, I.I., Allwood, E.G. Mishra, R. Booth, W.I. Aghamohammadzadeh, S. Goldberg, M.W. & Ayscough, K.R. (2012). Yeast Dynamin Vps1 and Amphiphysin Rvs167 Function Together During Endocytosis. *Traffic* 13(2), 317-328.
- Smaczynska-de Rooij, I.I., Marklew, C.J., Palmer, S.E., Allwood, E.G. & Ayscough, K.R. (2019). Mutation of key lysine residues in the Insert B region of the yeast dynamin Vps1 disrupts lipid binding and causes defects in endocytosis. *PloS one* 14(4), e0215102.
- Small, J.V., Stradal, T., Vignal, E. & Rottner, K. (2002). The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol* 12(3), 112-20.
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D. L. & van der Bliek, A. M. (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 12, 2245–2256.
- Spudich, J.A. (1994). How molecular motors work. *Nature* 372(6506), 515-8.
- Söderberg, O., Gullberg, M., Jarvius, M., Ridderstråle, K., Leuchowius, K.J., Jarvius, J., Wester, K., Hydbring, P., Bahram, F., Larsson, L.G. & Landegren, U. (2006). Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods* 3, 995-1000.
- Somsel, R.J. & Wandinger-Ness, A. (2000). Rab GTPases coordinate endocytosis. *J Cell Sci* 113(2), 183-192.
- Song, Y., Kirkpatrick, L.L., Schilling, A.B., Helseth, D.L., Chabot, N., Keillor, J.W., Johnson, G.V.W. & Brady, S.T. (2013). Transglutaminase and Polyamination of Tubulin: Posttranslational Modification for Stabilizing Axonal Microtubules. *Neuron*, 78(1), 109-123.

- Sonnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J. & Zerial, M. (2000). Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol* 149, 901-914.
- Staeheli, P. & Sutcliffe, J.G. (1988) Identification of a second interferon-regulated murine Mx gene. *Mol Cell Biol* 8, 4524-8.
- Ståhl, A.L., Johansson, K., Mossberg, M., Kahn, R. & Karpman, D. (2019). Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology, and renal diseases. *Pediatr Nephrol* 34(1), 11-30.
- Stehbens, S.J., Paszek, M., Pemble, H., Ettinger, A., Gierke, S. & Wittmann, T. (2014). CLASPs link focal-adhesion-associated microtubule capture to localized exocytosis and adhesion site turnover. *Nat Cell Biol* 16, 561–573.
- Stehbens, S. & Wittmann, T. (2012). Targeting and transport: how microtubules control focal adhesion dynamics. *J Cell Biol* 198(4), 481-9.
- Stein, M., Wandinger-Ness, A. & Roitbak, T. (2002). Altered trafficking and epithelial cell polarity in disease. *Trends Cell Biol* (8), 374-81.
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 513-25.
- Stertz, S., Reichelt, M., Krijnse-Locker, J., Mackenzie, J., Simpson, J.C., Haller, O. & Kochs, G. (2006). Interferon-induced, antiviral human MxA protein localizes to a distinct subcompartment of the smooth endoplasmic reticulum. *J Interferon Cytokine Res* 26,650-60.
- Stokin, G.B., Lillo, C., Falzone, T.L., Brusch, R.G., Rockenstein, E., Mount, S.L., Raman, R., Davies, P., Masliah, E., Williams, D.S. & Goldstein, L.S. (2005). Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science* 307, 1282-1288.
- Stoops, E.H. & Caplan, M.J. (2014). Trafficking to the Apical and Basolateral Membranes in Polarized Epithelial Cells. *J Am Soc Nephrol* 25(7), 1375-86.
- Sweitzer S.M. & Hinshaw J.E. (1998). Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell* 93, 1021-1029.
- Szyk, A., Deaconescu, A.M., Piszczek, G. & Roll-Mecak, A. (2011). Tubulin tyrosine ligase structure reveals adaptation of an ancient fold to bind and modify tubulin. *Nat Struct Mol Biol* 18, 1250-1258.
- Szyk, A., Piszczek, G. & Roll-Mecak, A. (2013). Tubulin tyrosine ligase and stathmin compete for tubulin binding in vitro. *J Mol Biol* 425, 2412-2414.
- Tai, A.W., Chuang, J. Z., Bode, C., Wolfrum, U. & Sung, C.H. (1999). Rhodopsin's carboxy-terminal cytoplasmic tail acts as a membrane receptor for cytoplasmic dynein by binding to the dynein light chain Tctex-1. *Cell* 97, 877-887.
- Takeda, T., Yamazaki, H. & Farquhar, M.G. (2003). Identification of an apical sorting determinant in the cytoplasmic tail of megalin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol* 284, C1105-C1113.
- Tanabe, K. & Takei, K. (2009). Dynamic instability of microtubules requires dynamin 2 and is impaired in a Charcot-Marie-Tooth mutant. *J Cell Biol* 185(6), 939-48.
- Taylor, G.A., Stauber, R., Rulong, S., Hudson, E., Pei, V., Pavlakis, G.N., Resau, J.H. & Vande Woude, G.F. (1997). The inducibly expressedGTPase localizes to the endoplasmic reticulum, independently of GTPbinding. *J Biol Chem* 272, 10639-10445.
- Terada, S., Kinjo, M., Aihara, M., Takei, Y. & Hirokawa, N. (2010). Kinesin-1/Hsc70-dependent mechanism of slow axonal transport and its relation to fast axonal transport. *EMBO J* 29, 843-854.
- Theisen, U., Straube, E. & Straube, A. (2012). Directional persistence of migrating cells requires Kif1C-mediated stabilization of trailing adhesions. *Dev Cell* 23(6):1153-66.
- Thomas, M. & Legembre, P. (2017) Proximity ligation assay (PLA) to evaluate DISC and MISC composition. *Methods Mol Biol* 1557, 41-48.
- Thompson, W.C. (1977). Post-translational addition of tyrosine to alpha tubulin in vivo in intact brain and in myogenic cells in culture. *FEBS letters* 80, 9-13.

- Thompson, H.M., Cao, H., Chen, J., Euteneuer, U. & McNiven, M.A. (2004). Dynamin 2 binds gamma-tubulin and participates in centrosome cohesion. *Nat Cell Biol* 6, 335-342.
- Thyberg, J. & Moskalewski, S. (1985). Microtubules and the organization of the Golgi complex. *Exp Cell Res* 159, 1-16.
- Titus, M.A. & Gilbert, S.P. (1999). The diversity of molecular motors: an overview. *Cell Mol Life Sci* 56, 18-183.
- Toya, M. & Takeich, M. (2016). Organization of Non-centrosomal Microtubules in Epithelial Cells. *Cell Stuct Funct* 41, 127-135.
- Toyokawa, K., Carling, S. & Ott, T. L. (2007a). Cellular localization and function of the antiviral protein, ovine Mx1 (oMx1): I. Ovine Mx1 is secreted by endometrial epithelial cells via an 'unconventional' secretory pathway. *Am J Reprod Immunol* 57(1), 23-33.
- Toyokawa, K., Leite, F. & Ott, T.L. (2007b). Cellular localization and function of the antiviral protein, ovine Mx1 (oMx1): II. The oMx1 protein is a regulator of secretion in an ovine glandular epithelial cell line. *Am J Reprod Immunol* 57(1), 13-22.
- Traub, L.M. (2009). Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 583-96.
- Urban, J., Parczyk, K., Leutz, A., Kayne, M. & Kondor-Koch, C. (1987). Constitutive apical secretion of an 80-kD sulfated glycoprotein complex in the polarized epithelial Madin-Darby canine kidney cell line. *J Cell Biol*, 105, 2735-43.
- Uthaiyah, R.C., Praefcke, G.J., Howard, J.C. & Herrmann, C. (2003). IIGP1, an interferon-gamma-inducible 47-kDa GTPase of the mouse, showing cooperative enzymatic activity and GTP-dependent multimerization. *J Biol Chem* 278, 29336-29343.
- Vale, R.D. (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112, 467-480.
- Vale, R.D. & Fletterick, R.J. (1997). The design plan of kinesin motors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 745-777.
- Vale, R.D. & Milligan, R.M. (2000). The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science*, 288, 88-95.
- Vale, R.D., Reese, T.S. & Sheetz, M.P. (1985). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42(1), 39-50.
- Valentich, J.D. (1981). Morphological similarities between the dog kidney cell line MDCK and the mammalian cortical collecting tubule. *Ann N Y Acad Sci* 372, 384-405.
- Valenzuela, P., Quiroga, M., Zaldivar, J., Rutter, W.J., Kirschner, M.W. & Cleveland, D.W. (1981). Nucleotide and corresponding amino acid sequences encoded by alpha and beta tubulin mRNAs. *Nature*. 289, 650-655.
- Vallee, R.B., Williams, J.C., Varma, D. & Barnhart, L.E. (2004). Dynein: an ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *J Neurobiol* 58, 189-200.
- van der Bliek, A.M. (1999). Functional diversity in the dynamin family. *Trends Cell Biol* 9, 96-102.
- van der Bliek, A.M. & Meyerowitz, E.M. (1991). Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila* gene involved in endocytosis. *Nature* 351, 411-414.
- van Dijk, J., Rogowski, K., Miro, J., Lacroix, B., Eddé, B. & Janke, C. (2007). A targeted multienzyme mechanism for selective microtubule polyglutamylation. *Mol Cell* 26, 437-448.
- van Meer, G. & Simons, K. (1986). The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells. *EMBO J*. 5, 1455-1464.
- van Meer, G. & Simons, K. (1988). Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *J Cell Biochem* 36, 51-58.
- Vasiliev, J.M., Gelfand, I.M., Domnina, L.V., Ivanova, O.Y., Komm, S.G. & Olshevskaja, L.V. (1970). Effect of colcemid on the locomotory behaviour of fibroblasts. *J Embryol Exp Morphol* 24, 625-40.
- Vassilieva, E.V. & Nusrat, A. (2008). Vesicular trafficking: molecular tools and targets. *Methods Mol Biol* 440, 3-14.

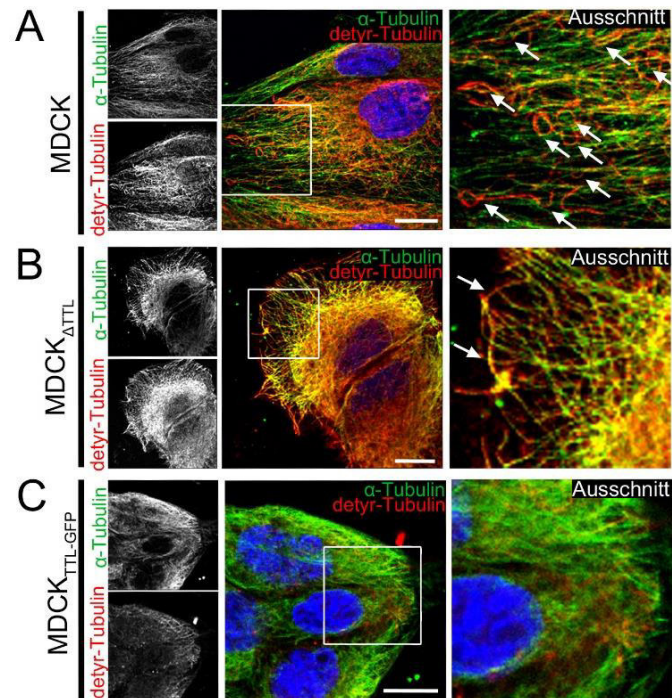
- Vater, C.A., Raymond, C.K., Ekena, K., Howaldstevenson, I. & Stevens, T.H. (1992). The Vps1 Protein, a Homolog of Dynamin Required for Vacuolar Protein Sorting in *Saccharomyces-Cerevisiae*, Is a Gtpase with 2 Functionally Separable Domains. *J Cell Biol* 119(4), 773-86.
- Verhelst, J., De Vlieger, D. & Saelens, X. (2015). Co-immunoprecipitation of the mouse Mx1 protein with the influenza A virus nucleoprotein. *J Vis Exp*.
- Verhelst, J., Hulpiau, P. & Saelens, X. (2013). Mx proteins: antiviral gatekeepers that restrain the uninvited. *Microbiol Mol Biol Rev* 77, 551-66.
- Verhey, K.J. & Gaertig, J. (2007). The tubulin code. *Cell Cycle* 6, 2152-2160.
- Verhey, K.J., Kau, I.N. & Soppina, V. (2011). Kinesin assembly and movement in cells. *Annu Rev Biophys* 40, 267-288.
- Vetter, I.R. & Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294, 1299-1304.
- Vicente-Manzanares, M., Webb, D. J. & Horwitz, A.R. (2005). Cell migration at a glance. *J Cell Sci* 118, 4917-19.
- Vieira, O.V., Verkade P., Manninen A. & Simons K. (2005). FAPP2 is involved in the transport of apical cargo in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* 170, 521-526.
- von Der Malsburg, A., Abutbul-Ionita, I., Haller, O., Kochs, G. & Danino, D. (2011). Stalk domain of the dynamin-like MxA GTPase protein mediates membrane binding and liposome tubulation via the unstructured L4 loop. *J Biol Chem*, 286, 37858-65.
- Wade, R.H. & Hyman, A.A. (1997). Microtubule structure and dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 9, 12-17.
- Wadsworth, P. (1999). Regional regulation of microtubule dynamics in polarized, motile cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 42, 48-59.
- Waterman-Storer, C.M. & Salmon, E.D. (1997). Actomyosin-based retrograde flow of microtubules in the lamella of migrating epithelial cells influences microtubule dynamic instability and turnover and is associated with microtubule breakage and treadmilling. *J Cell Biol* 139, 417-34.
- Webster, D.R., Gundersen, G.G., Bulinski, J.C. & Borisy, G.G. (1987a). Differential turnover of tyrosinated and detyrosinated microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 9040-9044.
- Webster, D.R., Gundersen, G.G., Bulinski, J.C. & Borisy, G.G. (1987b) Assembly and turnover of detyrosinated tubulin in vivo. *J Cell Biol* 105, 265-276.
- Webster, D.R., Wehland, J., Weber, K. & Borisy, G.G. (1990). Detyrosination of alpha tubulin does not stabilize microtubules in vivo. *J Cell Biol* 111, 113-122.
- Wehland, J. & Weber, K. (1987). Turnover of the carboxy-terminal of alpha-tubulin and means of reaching elevated levels of detyrosination in living cells. *J Cell Sci* 88, 185-203.
- Weijer, C.J. (2009). Collective cell migration in development. *J Cell Sci* 122, 3215-23.
- Weisz, O.A. & Rodriguez-Boulán, E. (2009). Apical trafficking in epithelial cells: signals, clusters and motors. *J Cell Sci* 122, 4253-66.
- Wen, Y., Eng, C. H., Schmoranz, J., Cabrera-Poch, N., Morris, E. J., Chen, M., Wallar, B. J., Alberts, A. S., & Gundersen, G. G. (2004). EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nat Cell Biol* 6, 820-830.
- Whipple, R.A., Cheung, A.M. & Martin, S.S. (2007). Detyrosinated microtubule protrusions in suspended mammary epithelial cells promote reattachment. *Exp Cell Res* 15, 1326-1336.
- Whipple, R.A., Matrone, M.A., Cho, E.H., Balzer, E.M., Vitolo, M.I., Yoon, J.R., Ioffe, O.B., Tuttle, K.C., Yang, J. & Martin, S. S. (2010). Epithelial-to-mesenchymal transition promotes tubulin detyrosination and microtentacles that enhance endothelial engagement. *Cancer Res* 70, 8127-813.
- Whipple, R.A., Vitolo, M.I., Boggs, A.E., Charpentier, M.S., Thompson, K. & Martin, S.S. (2013). Parthenolide and costunolide reduce microtentacles and tumor cell attachment by selectively targeting detyrosinated tubulin independent from NF- $\kappa$ B inhibition. *Breast Cancer Res*, 15, R83.

- Willenborg, C. & Prekeris, R. (2011). Apical protein transport and lumen morphogenesis in polarized epithelial cells. *Biosci Rep* 31(4), 245-256.
- Wilsbach, K. & Payne, G.S. (1993). Vps1p, a member of the dynamin GTPase family, is necessary for Golgi membrane-protein retention in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal* 12(8), 3049-59.
- Wittmann, T., Bokoch, G.M. & Waterman-Storer, C.M. (2003). Regulation of leading edge microtubule and actin dynamics downstream of Rac1. *J Cell Biol* 161(5), 845-51.
- Xue, X., Jaulin, F., Espenel, C. & Kreitzer, G. (2010). PH-domain-dependent selective transport of p75 by kinesin-3 family motors in non-polarized MDCK cells. *J Cell Sci* 123(10), 1732-41.
- Yadav, S., Puri, S. & Linstedt, A.D. (2009). A primary role for Golgi positioning in directed secretion, cell polarity, and wound healing. *Mol Biol Cell* 20, 1728-36.
- Yeaman C., Grindstaff K. & Nelson W.J. (1999). New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity. *Physiol Rev* 79, 73-98.
- Yeaman, C., Le Gall, A.H., Baldwin, A.N., Monlauzeur, L., Le Bivic, A. & Rodriguez-Boulant, E. (1997). The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* 139, 929-940.
- Yoon, Y., Pitts, K.R. & McNiven, M.A. (2001). Mammalian dynamin-like protein DLP1 tubulates membranes. *Mol Biol Cell* 12, 2894-2905.
- Yu, X. & Cai, M. (2004). The yeast dynamin-related GTPase Vps1p functions in the organization of the actin cytoskeleton via interaction with Sla1p. *J Cell Sci* 117(17), 3839-53.
- Yuan, H. & Sehgal, P.B. (2016). MxA is a novel regulator of endosome-associated transcriptional signaling by bone morphogenetic proteins 4 and 9 (BMP4 and BMP9). *PLoS One* 11(11): e0166382.
- Zerrahn, J., Schaible, U.E., Brinkmann, V., Gühlich, U. & Kaufmann, S.H. (2002). The IFN-inducible Golgi- and endoplasmic reticulum-associated 47-kDa GTPase IIGP is transiently expressed during listeriosis. *J Immunol* 168, 3428-36.
- Zhang, Y.C., Zhou, Y., Yang, C.Z. & Xiong, D.S. (2009). A review of ERGIC-53: its structure, functions, regulation and relations with diseases. *Histol Histopathol* 24, 1193-1204.
- Zheng, Y., Wong, M.L., Alberts, B. & Mitchison, T. (1995). Nucleation of microtubule assembly by a  $\gamma$ -tubulin-containing ring complex. *Nature* 378, 578-583.
- Zink, S., Grosse, L., Freikamp, A., Bänfer, S., Müksch, F. & Jacob, R. (2012). Tubulin detyrosination promotes monolayer formation and apical trafficking in epithelial cells. *J Cell Sci* 125, 5998-6008.
- Zink, S. & Jacob, R. (2015). Tubulin Detyrosination in Epithelial Cells. In: Schatten H. (eds) *The Cytoskeleton in Health and Disease*. Springer, New York, NY.



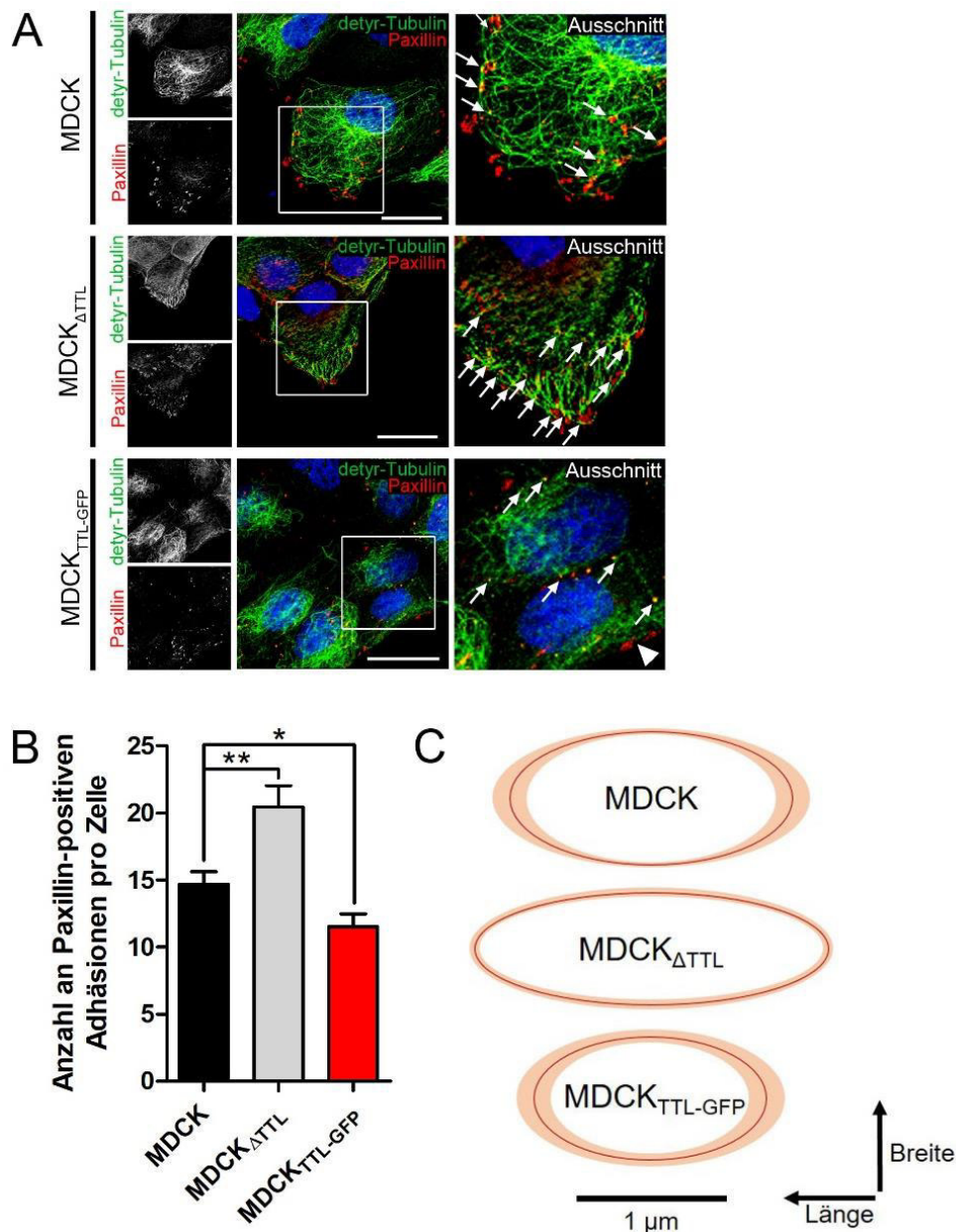
## 6. Anhang

### 6.1. Ergänzende Ergebnisse



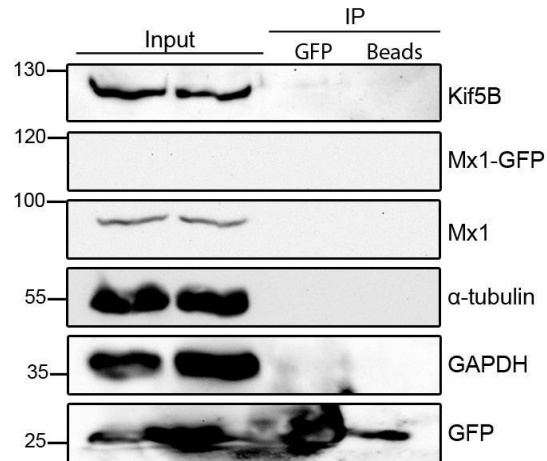
**Abb. 6.1. Morphologie der Mikrotubuli in MDCK-, MDCK $\Delta$ TTL- und MDCK $\Delta$ TTL-GFP-Zellen**

In unpolaren MDCK- (A), MDCK $\Delta$ TTL- (B) und MDCK $\Delta$ TTL-GFP-Zellen (C) wurde eine Immunfluoreszenz gegen  $\alpha$ -Tubulin (Alexa Fluor 555) und detyr-Tubulin (Alexa Fluor 647) durchgeführt. Das Mikrotubuli-buckling ist mit Pfeilen markiert. Zellkerne wurden mit Hoechst33342 (blau) gefärbt. Maßstab: 10  $\mu$ m.



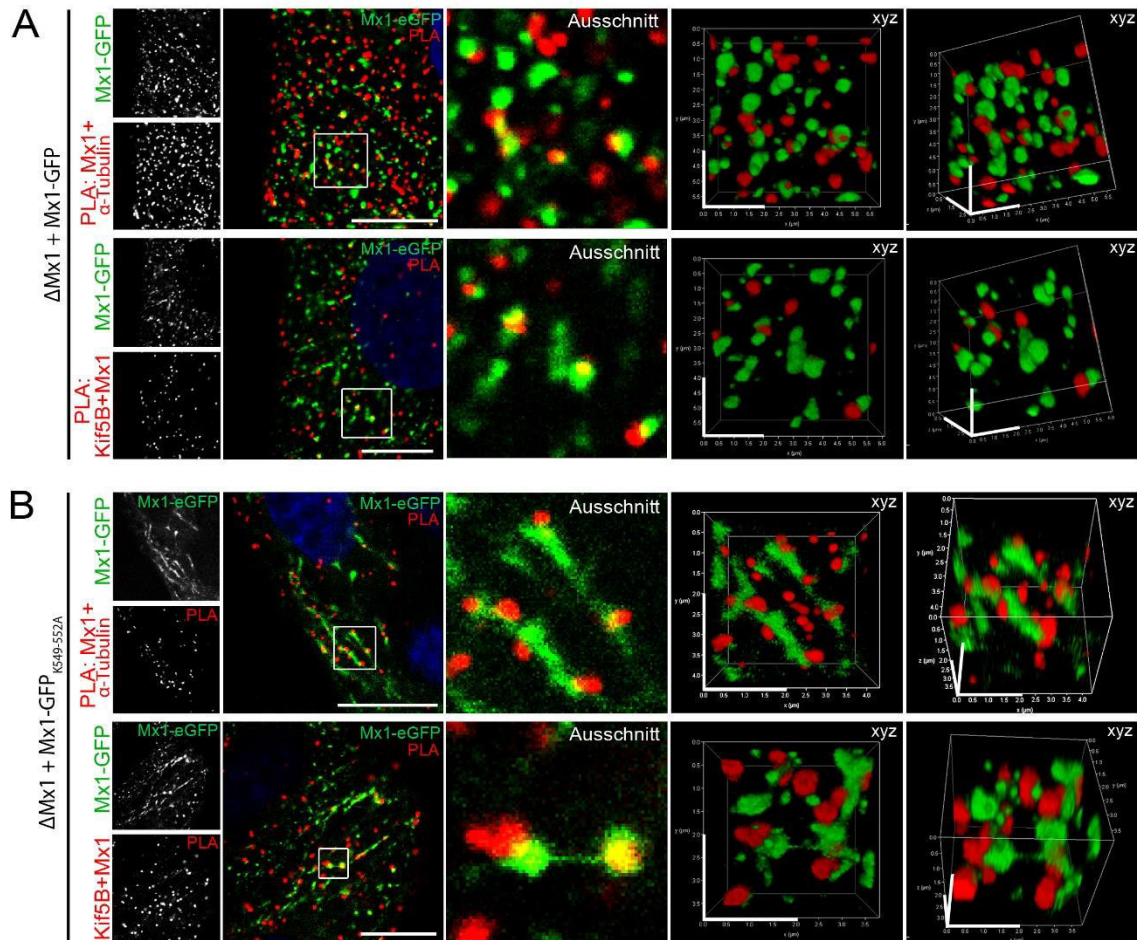
**Abb. 6.2. Zusammenhang zwischen der Tubulin-Detyrosinierung und der Anzahl und Größe Paxillin-positiver fokaler Adhäsionen**

(A) Unpolare MDCK-, MDCK $\Delta$ TTL- und MDCK $_{TTL-GFP}$ -Zellen wurden fixiert und gegen Paxillin (Alexa Fluor 647) zusammen mit detyr-Tubulin (Alexa Fluor 555) immungefärbt. Die Pfeile markieren Paxillin-positive fokale Strukturen, die mit detyr-Tubulin assoziiert sind. Diese Fokalkontakte sind in Richtung der Migration orientiert. Die Pfeilspitzen markieren Paxillin-positive fokale Adhäsionen, die am Rand der isolierten Inseln bestehend aus MDCK $_{TTL-GFP}$ -Zellen angeordnet sind. Zellkerne wurden mit Hoechst33342 (blau) gefärbt. Maßstab: 25  $\mu$ m. (B) Quantifizierung der Paxillin-positiven Fokaladhäsionen pro Zelle. Die Analyse auf statistische Signifikanz erfolgte mit einem t-Test, n=3. (C) Schematische Darstellung der Form und durchschnittlichen Größe (rote Linie) von Paxillin-positiven Adhäsionen in MDCK-, MDCK $\Delta$ TTL- und MDCK $_{TTL-GFP}$ -Zellen. SD ist in orange dargestellt. Maßstab: 1  $\mu$ m.



**Abb. 6.3. Kontrolle für die GFP-Co-Immunpräzipitation aus Abb. 3.14., Abb. 3.15. und Abb. 3.17.**

Zur Kontrolle wurde eine Co-Immunpräzipitation mit ungekoppeltem GFP durchgeführt. Eine unspezifische Bindung von Kif5B oder α-Tubulin an das immunpräzipitierte GFP konnte auf diese Weise ausgeschlossen werden. Verwendet wurden Antikörper gegen Kif5B, Mx1, α-Tubulin, GAPDH und GFP.



**Abb. 6.4. Mx1-GFP und Mx1-GFP<sub>K549-552A</sub> befinden sich in räumlicher Nähe zu Kif5B und α-Tubulin**  
MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP</sub> (A) und MDCK<sub>ΔMx1+Mx1-GFP\_K549-552A</sub>-Zellen (B) wurden einem PLA unterzogen und anschließend im KLSM ausgewertet. Verwendet wurden Antikörper gegen Mx1 und α-Tubulin oder Kif5B. Maßstab: 10 μm. 3D-Aufnahmen sind auf der rechten Seite dargestellt (xyz). Maßstab: 2 μm.

## 6.2. Abkürzungsverzeichnis

+TIP	<i>plus end tracking proteins</i>
$\alpha$ TAT1	$\alpha$ -Tubulin Acetyltransferase 1
AEE	<i>apical early endosome</i> , apikales frühes Endosom
AFC	<i>Adaptive Focus Control</i> , adaptiven Fokuskontrolle
AP	Adapterprotein
ARE	<i>apical recycling endosome</i> , apikale Recyclingendosom
ATP	Adenosintriphosphat
BEE	<i>basolateral early endosome</i> , basolaterales frühes Endosom
BDLP	<i>bacterial dynamin-like protein</i>
BSE	Bündelsignalelement
C-Terminus	Carboxy-Terminus
C-terminal	Carboxy-terminal
CAPs	<i>cytoskeletal-associated proteins</i>
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
COPII	<i>coat protein complex II</i>
CRE	<i>common recycling endosome</i> , gemeinsames Recyclingendosom
CRISPR/Cas	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated</i>
CCV	<i>clathrin coated vesicle</i>
CCP	<i>clathrin coated pit</i>
ddH <sub>2</sub> O	Aqua bidestillata
DLP	<i>dynamin-like protein</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNM1L	<i>dynamin 1-like Protein</i>
Drp1	<i>dynamin-related protein 1</i>
DTT	Dithiothreitol
EHD	<i>EH domain containing protein</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	ER-Golgi Intermediärkompartiment
ESCRT	Endosomal Sorting Complex required for Transport
F-Aktin	filamentöses Aktin
FKS	Fötales Kälberserum
FLUAV	Influenza-A-Virus
FRAP	Fluorescence Recovery after Photobleaching
Fzo1	<i>fuzzy onions 1</i>
g	relative Zentrifugalbeschleunigung
Gal3	Galektin-3
GAP	<i>GTPase-activating proteins</i>
GBP	<i>guanylate-binding protein</i> , Guanylat-bindendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GED	GTPase-Effektordomäne
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factors</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GSDIM	<i>Ground State Depletion Microscopy Followed by Individual Molecule Return</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HRP	Horseradish Peroxidase
IIGP	<i>Interferon-inducible GTPase</i> , Interferon-induzierte GTPase
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
ILV	Intraluminale Vesikel

ISG	Interferon stimuliertes Gen
KLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
LPH	Laktase-Phlorizin-Hydrolase
MAP	<i>microtubule associated protein</i> , Mikrotubuli assoziiertes Protein
mA	Milliampere
mAb	Monoclonal antibody, monoklonaler Antikörper
MD	Mitteldomäne
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
Mgm1	<i>mitochondrial genome maintenance 1</i>
min	Minuten
mL	Milliliter
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MT	Mikrotubuli
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
MVB	Multivesikuläre Körperchen
Mx1	<i>Myxovirus Resistance Protein 1</i>
MxA	Humanes Mx1
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
N-WASP	<i>neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome protein</i>
nm	Nanometer
OPA1	<i>optic atrophy 1</i>
p75 <sup>NTR</sup>	Neurotrophinrezeptor p75 <sup>NTR</sup>
pAb	<i>polyclonal Antibody</i> , polyklonaler Antikörper
PAS	Protein A-Sepharose
PH	Pleckstrin <i>Homology</i>
PI	Proteinase-Inhibitoren-Mix
plg-R	polymerischer Immunglobulin-A-Rezeptor
PLA	Proximity Ligation Assay
pmol	Picomol
PMT	<i>Photomultiplier</i>
PRD	Prolin-reiche-Domäne
PSF	Punktspreizfunktion
PTM	posttranslationalen Modifikation
Rab	<i>Ras-related in brain</i>
RCA	<i>Rolling Circle Amplification</i>
RISC	<i>RNA-induced Silencing Complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
ROI	<i>Region of Interest</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SI	Saccharase-Isomaltase
SRP	<i>signal recognition particle</i> , Signalerkennungspartikel
STED	<i>Stimulated Emission Depletion</i>
SVPB	<i>Small Vasohibin Binding Protein</i>
TER	Transepithelialer Widerstand
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TIRF	<i>Total Internal Reflection Fluorescence</i>
TTL	Tubulin-Tyrosin-Ligase
V	Volt
VASH	Vasohibin
Vsp1	<i>Vacuolar protein sorting-associated protein 1</i>
VSV-G	<i>Vesicular stomatitis</i> Virus Glykoprotein G

v/v	volume/volume
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight/volume</i>

### 6.3. Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1.1.</b> Aufbau einer polaren Epithelzelle .....	2
<b>Abb. 1.2.</b> Organisation der Mikrotubuli in Abhängigkeit der Polarität einer Epithelzelle. 8	
<b>Abb. 1.3.</b> Lokalisierung und Funktion der Dynamin-Superfamilie Mitglieder .....	10
<b>Abb. 1.4.</b> Domänenarchitektur der humanen GTPasen der Dynamin-Superfamilie ....	11
<b>Abb. 1.5.</b> Struktur des humanen MxA .....	16
<b>Abb. 1.6.</b> Lokalisierung der posttranslationalen Modifikationen der Tubulin-Untereinheiten .....	22
<b>Abb. 2.1.</b> Kultivierung von MDCK Typ II Zellen in 2D- und 3D-Zellkultur.....	35
<b>Abb. 2.2.</b> Prinzip der Co-Immunpräzipitation .....	54
<b>Abb. 2.3.</b> Schema der Exosomen-Präparation .....	59
<b>Abb. 2.4.</b> Ablauf des in situ Proximity Ligation Assay .....	63
<b>Abb. 2.5.</b> Schematischer Aufbau eines Konfokalen Laser Scanning Mikroskops.....	67
<b>Abb. 2.6.</b> Prinzip des Anregung- und STED-Lasers.....	70
<b>Abb. 3.1.</b> Charakterisierung der MDCK-, MDCK <sub>ΔTTL</sub> - und MDCK <sub>TTL-GFP</sub> -Zellen.....	73
<b>Abb. 3.2.</b> Veränderungen in der Morphologie nach Modulation der TTL-Expression ..	75
<b>Abb. 3.3.</b> Mikrotubuli-Dynamik und Zusammensetzung von Mikrotubuli .....	78
<b>Abb. 3.4.</b> Einfluss der Tubulin-Detyrosinierung auf die Zellmigration .....	80
<b>Abb. 3.5.</b> Untersuchung der Verteilung von detyr-Tubulin und Fokaladhäsionen während des Wundheilungs-Tests .....	82
<b>Abb. 3.6.</b> Zusammenhang zwischen der Tubulin-Detyrosinierung und der Anzahl und Größe Vinculin-positiver fokaler Adhäsionen.....	84
<b>Abb. 3.7.</b> Expression von Vinculin in Abhängigkeit der TTL-Expression .....	85
<b>Abb. 3.8.</b> Proximity Ligation Assay von detyr-Tubulin und Vinculin sowie Paxillin.....	86
<b>Abb. 3.9.</b> Mx1 assoziiert mit Membranen des ER und Endosomen .....	89
<b>Abb. 3.10.</b> FRAP-Analyse von Mx1-GFP: Mx1 assoziiert dynamisch mit intrazellulären Membranen.....	93
<b>Abb. 3.11.</b> Rolle von Mikrotubuli in der Dynamik von Mx1-positiven Strukturen .....	95
<b>Abb. 3.12.</b> Die Dynamik von Mx1-positiven Strukturen ist abhängig von der Mikrotubuli-Integrität .....	96
<b>Abb. 3.13.</b> Visualisierung von Mx1 und Mikrotubuli .....	98
<b>Abb. 3.14.</b> Mx1 assoziiert mit Mikrotubuli .....	99
<b>Abb. 3.15.</b> Mx1 assoziiert mit detyrosiniertem und tyrosiniertem $\alpha$ -Tubulin.....	100



<b>Abb. 3.16.</b> Mx1 assoziiert mit Mitgliedern der Kinesin-1-Familie, insbesondere mit Kif5B .....	102
<b>Abb. 3.17.</b> Mx1 interagiert mit dem Motorprotein Kif5B.....	104
<b>Abb. 3.18.</b> Mx1- <i>Knockout</i> beeinflusst die Sekretion von Gal3 und Clusterin/gp80 .....	106
<b>Abb. 3.19.</b> Austausch der vier Lysine in der L4-Schleife von Mx1 zu Alanin führt zu einer veränderten Vesikel-Morphologie .....	109
<b>Abb. 3.20.</b> Mx1-GFP und Mx1-GFP <sub>K549-552A</sub> befinden sich in räumlicher Nähe zu Kif5B.....	112
<b>Abb. 3.21.</b> Die Mutation im Membran-Interaktionsmotiv verändert das dynamische Verhalten von Mx1 .....	113
<b>Abb. 3.22.</b> Die Mutation im Membran-Interaktionsmotiv von Mx1 führt zu Veränderungen in der Membranbindung.....	115
<b>Abb. 3.23.</b> Die Mutation im Membran-Interaktionsmotiv von Mx1 führt zu Veränderungen in der Mx1-Assemblierung und dem apikalen Proteintransport .....	116
<b>Abb. 4.1.</b> Zusammenfassendes Modell dieser Arbeit.....	147
<b>Abb. 6.1.</b> Morphologie der Mikrotubuli in MDCK-, MDCK <sub>ΔTTL</sub> - und MDCK <sub>TTL-GFP</sub> -Zellen.....	170
<b>Abb. 6.2.</b> Zusammenhang zwischen der Tubulin-Detyrosinierung und der Anzahl und Größe Paxillin-positiver fokaler Adhäsionen .....	171
<b>Abb. 6.3.</b> Kontrolle für die GFP-Co-Immunpräzipitation aus Abb. 3.14., Abb. 3.15. und Abb. 3.17.....	172
<b>Abb. 6.4.</b> Mx1-GFP und Mx1-GFP <sub>K549-552A</sub> befinden sich in räumlicher Nähe zu Kif5B und α-Tubulin .....	172

#### 6.4. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 2.1</b> Verwendete Chemikalien .....	31
<b>Tabelle 2.2</b> Verbrauchsmaterialien .....	32
<b>Tabelle 2.3</b> Verwendete Primärantikörper .....	33
<b>Tabelle 2.4</b> Verwendete Sekundärantikörper .....	33
<b>Tabelle 2.5.</b> Verwendete Zelllinien und ihre Eigenschaft(en) .....	37
<b>Tabelle 2.6</b> Verwendete Plasmide .....	39

## **6.5. Lebenslauf**

Die Seite 177 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten. Aus diesem Grund ist diese nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.



## 6.6. Publikationen und Beiträge auf Konferenzen

Teile dieser Arbeit wurden in dem folgenden Fachartikel publiziert:

**Ringer, K.**, Riehl, J., Müller, M., Dewes, J., Hoff, F. & Jacob, R. (2018). The large GTPase Mx1 binds Kif5B for cargo transport along microtubules. *Traffic* 19(12), 947-964.

Teile dieser Arbeit wurden auf den folgenden Konferenzen vorgestellt:

Poster:

**Ringer, K.**, & Jacob, R: *Dynamic Regulation of Microtubule Assembly in Epithelial Plasticity*. Ladies' Science Club meets GRK 2213 (2017).

**Ringer, K.**, Riehl, J., Müller, M., Hoff, F. & Jacob, R: *The large GTPase Mx1 binds KIF5B for cargo transport along microtubules*. ASCB Meeting, San Diego, USA (2018).

Vortrag:

**Ringer, K.**, Riehl, J., Müller, M., Dewes, J., Hoff, F. & Jacob, R. *The large GTPase Mx1 binds KIF5B for cargo transport along microtubules*. Internationales PhD Symposium des GRK2213, Marburg (2019).

Weitere Publikationen:

Hönig, E., **Ringer, K.**, Dewes, J., von Mach, T., Kamm, N., Kreitzer, G. & Jacob R (2018). Galectin-3 modulates the polarized surface delivery of  $\beta$ 1-integrin in epithelial cells. *J Cell Sci* 11, 131(11).

## 6.7. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer/-innen in Erlangen waren die Damen und Herren:

Berens, Biburger, Brandstätter, Brehm, Brettreich, Burkovski, Dietrich, Drewello, Feigenspan, Frasch, Heimler, Hirsch, Huß, Ivanović-Burmazović, Keller, Klebl, Klingler, Koch, Kost, Kreimer, Kreis, Lebert, Lindlein, Meyerhoff, Müller-Uri, Nimmerjahn, Nitschke, Richter, Rübsam, Sauer, Schmidl, Schoppmeier, Seidel, Slany, Sonnewald, Stadler, Trauner, Winkler, Weiß

Meine akademischen Lehrer/-innen in Marburg waren die Damen und Herren:

Arenz, Daut, Elsässer, Green, Hänze, Hoyer, Jacob, Lill, Mühlhoff, Reningunta, Schäfer, Stehling, Stiewe

## 6.8. Danksagung

Ich möchte hiermit die Möglichkeit nutzen, einigen Personen zu danken, die mich in diesem wichtigen Lebensabschnitt begleitet, unterstützt und motiviert haben.

Ein besonderes Dankeschön gebührt meinem Doktorvater Prof. Dr. Ralf Jacob für die beiden spannenden Themen meiner Promotionsarbeit und seine tolle Betreuung, seine unendliche Geduld, die zahlreichen Ratschläge und vor allem sein immer offenes Ohr. Sehr dankbar bin ich auch für die vielen, anregenden Diskussionen, die mir jederzeit weitergeholfen haben. Ich möchte mich auch für die Möglichkeit bedanken, meine Ergebnisse am ASCB-Meeting in San Diego präsentieren zu dürfen. Die Reise war ein wunderschönes und unvergessliches Erlebnis.

Für die Finanzierung meiner Arbeit danke ich dem Graduiertenkolleg 2213 „*Membrane plasticity in tissue development and remodeling*“. Außerdem möchte ich mich für die Organisation bei Frau Prof. Dr. Annette Borchers und Katja Geßner bedanken.

Für die Durchführung der FRAP-Analyse danke ich Herrn Dr. Oliver Schlicker sehr herzlich. Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Christoph Greb für seine Rolle als Mentor.

Besonders danken möchte ich auch allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Jacob für die angenehme und familiäre Arbeitsatmosphäre sowie für die tolle Zeit, die wir miteinander verbracht haben. Ein großer Dank geht an dieser Stelle an Waltraud Ackermann, Natalia Kamm und Martina Dienst, die mich tatkräftig bei vielen Versuchen unterstützt haben. Darüber hinaus möchte ich mich bei Ellena Hönig, Sebastian Bänfer und Florian Hoff bedanken. Vor allem Ellena Hönig, die mir in unserer gemeinsamen Zeit im Labor mit Rat und Tat zur Seite stand, möchte ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft herzlich danken. In diesem Rahmen möchte ich mich auch bei Sabrina Zink und Florian Hoff bedanken, die mit ihren Arbeiten die Grundlage für diese Dissertation gelegt haben. Ein großes Dankeschön geht an Jana Riehl und Manuel Müller, die als Bachelor- und/oder Master-Studenten erfolgreich an den Projekten mitgearbeitet haben und immer für gute Stimmung gesorgt haben. Danke auch an Sophia Hasenjäger für die lustigen Gespräche während ihrer Zeit bei uns im Labor.

Für die schöne Zeit, den freundlichen und kollegialen Umgang miteinander sowie die stetige Hilfsbereitschaft, die mir entgegengebracht wurde, möchte ich mich bei dem

gesamten Institut für Zytobiologie bedanken. Für seine freundliche Hilfe bei dem einen oder anderen Computer-Problem bedanke ich mich bei Ralf Rösser. Für die Hilfe bei organisatorischen Belangen geht ein großes Dankeschön auch an unsere Sekretärin Carina Beimborn sowie an unsere ehemalige Sekretärin Gisela Lesch. Vor allem unsere schönen Betriebsausflüge und Weihnachtsfeiern werde ich nicht vergessen. Für die schönen Grillabende danke ich Sebastian Bänfer, Somsuvro Basu, Stefan Christ, Ellena Hönig, Carolina Goralik, David Fuhrmann und Christian Schink.

Ich bedanke mich vor allem bei Stefanie Lübke. Die gemeinsame Zeit im GRK, die schönen Telefonate während dem Verfassen dieser Arbeit motivierten mich sehr.

Ich bedanke mich von ganzem Herzen bei den wichtigsten Menschen in meinem Leben, meinem Freund und meiner Familie, für ihre liebevolle, bedingungslose Unterstützung und ihren stetigen Rückhalt. Danke, dass ihr meine Launen während der langen Zeit ertragen und mich immer zum Lachen gebracht habt. Meinem Freund danke ich für sein Verständnis und dass er mit mir die Höhen und Tiefen einer Fernbeziehung geteilt hat. Vor allem meinen Eltern und meiner Schwester bin ich sehr dankbar für die Dinge, die allzu oft als selbstverständlich angesehen werden. Ohne Euch hätte ich es nicht geschafft.

### 6.9. Ehrenwörtlich Erklärung

„Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

**„Komponenten und Wege von post-Golgi Vesikeln beim Transport zur apikalen Plasmamembran“**

im Institut für Zytobiologie und Zytopathologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Roland Lill mit Unterstützung durch Prof. Dr. Ralf Jacob ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ich versichere, dass ich sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe.

Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

Vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

**Ringer. K., Riehl. J., Müller. M., Dewes. J., Hoff. F. & Jacob, R. (2018).** The large GTPase Mx1 binds Kif5B for cargo transport along microtubules. Traffic 19(12):947-964.

---

<b>Ort, Datum</b>	<b>Karina Ringer</b>
-------------------	----------------------

„Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen.“

---

<b>Ort, Datum</b>	<b>Prof. Dr. Ralf Jacob</b>
-------------------	-----------------------------